Analytisch-chemische Untersuchung des Kaliummangels bei Chlorella im Vergleich mit anderen Mangelzuständen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Samir Soliman Aly Badour
aus Kairo

Göttingen 1959

Analytisch-chemische Untersuchung des Kaliummangels bei Chlorella im Vergleich mit anderen Mangelzuständen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

vorgelegt von
Samir Soliman Aly Badour
aus Kairo

Göttingen 1959

D 7

Referent: Prof. Dr. A. Pirson

Korreferent: Prof. Dr. H. G. Schlegel

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 11. 1959

Inhaltsverzeichnis

Einleitung 1

Methodisches 3

Kultur von Chlorella 3

Chlorophyll-Bestimmung 4

Kohlenhydrat-Bestimmung 6

Bestimmung des Gesamtstickstoffs 6

Bestimmung des Protein-Stickstoffs 7

Bestimmung der Phosphatfraktionen 8

A. Wachstum, Kohlenhydratgehalt, Protein und Chlorophyll bei Chlorella in Mineralsalzmangel 13

I. Kaliummangel 13

II. Wirkung des Kaliums auf Kaliummangelzellen im Licht und im Dunkeln 20

III. Vergleichsversuche mit anderen Mangelzuständen 25

1. Mg-Mangel 25

2. Mn-Mangel 28

3. Eisenmangel 29

B. Über den Phosphathaushalt von Chlorella bei Mineralsalzmangel 33

I. Kaliummangel 33

II. Die Wirkung von Kalium auf Chlorella-Zellen bei K-Mangel im Licht und im Dunkeln 36

1. In Gegenwart von CO_2 und Nitrat 38
2. Bei Fehlen von CO_2 und in Gegenwart von Nitrat 39
3. In Gegenwart von CO_2 und bei Fehlen von Nitrat 40
4. Bei Fehlen von CO_2 und Nitrat 42

III. Vergleichsversuche mit anderen Mangelzuständen 45

1. Mn-Wirkung auf Manganmangelzellen 47
2. Fe-Wirkung auf Eisenmangelzellen 47
3. Mg-Wirkung auf Mg-Mangelzellen 48

Besprechung der Ergebnisse 49

Zusammenfassung 55

Literaturverzeichnis 56

Einleitung

Die Frage, wieweit ein Element für das Wachstum und den normalen Stoffwechsel eines Organismus notwendig ist, steht an der Spitze der zahlreichen Probleme auf dem Gebiete der Mineralsalzernährung. PIRSON (1955) hat dieses Problem, besonders an Hand von Mangelerscheinungen, für die grünen Pflanzen eingehend diskutiert und dabei auf die Vorteile der Verwendung von einzelligen grünen Algen vom Chlorellatyp als Testorganismen im Ernährungsversuch hingewiesen, mit deren Hilfe in kurzer Zeit Mangelzustände jeglicher Art und jeden Grades erhalten und reproduziert werden können. Alle auf Gaswechsel beruhenden Stoffwechselveränderungen können unmittelbar und mit großer Genauigkeit bestimmt werden und dienen als empfindlicher Anzeiger für das erste Auftreten von Mangelsymptomen. Eine mehr dynamische Behandlung der Probleme kann durch die Anwendung einer "Erholungstechnik" erreicht werden, welche durch PIRSON (1937) eingeführt wurde; dabei wird der Gaswechsel der Mangelzellen vom Augenblick der Hinzuführung des Mangelelements an durch die nachfolgende Erholungsphase hindurch beobachtet. Die Anwendung dieses Verfahrens hat zu verschiedenen den Mangelzustand betreffenden Erkenntnissen geführt (vgl. PIRSON, TICHY u. WILHELMI 1952, BERGMANN 1955, DANIEL 1956 u. a.), wonach die Mangelerscheinungen gruppiert werden können in:

a) Störungen, die leicht und schnell behoben werden können und daher eine direkte funktionelle Beziehung zwischen Mineralstoffen und Stoffwechselprozessen zeigen (Photosynthese, endogene Atmung, oxydative Glucoseassimilation, Nitratassimilation).

b) Störungen, die nur sehr langsam behoben werden können und deren Wirkung auf einen Stoffwechselprozess daher nur indirekt zu sein scheint.

Bei der Annahme einer direkten oder primären physiologischen Wirkung ergibt sich jedoch folgende Schwierigkeit: Wenn ein Stoffwechselprozess (z. B. die Photosynthese) schnell und reversibel auf einen Mineralsalzmangel anspricht, so ist zwar eine direkte Beziehung zu dem betreffenden mineralischen Faktor, doch der Mechanismus dieser Wirkung bleibt ungeklärt. Im allgemeinen ist unbekannt, ob ein Ion einen spezifischen Einfluß auf die protoplasmatische Struktur des Reaktionssystems hat oder

ob es die Synthese von Komponenten des Reaktionssystems beeinflußt, die einem raschen "turn-over" unterliegen. Aus diesem Grunde muß die Gaswechselanalyse von Mangelerscheinungen durch eine verfeinerte chemische Analyse ergänzt werden.

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, bei der einzelligen Grünalge Chlorella zu untersuchen, wieweit die chemische Analyse der organischen Hauptbestandteile im Mangelzustand dazu beitragen kann, die Symptome des Mineralmangels näher zu kennzeichnen. Die Anwendung der "Erholungstechnik" ist hierbei notwendig, um den Einfluß der Hinzufügung des mangelnden Elements auf den zuvor bestehenden Mangelzustand zu verfolgen.

Kaliummangel wurde zum Hauptgegenstand der vorliegenden Untersuchung gemacht, vor allem wegen der zahlreichen durch manometrische Methoden auf diesem Gebiet gewonnenen Ergebnisse und im Hinblick auf eine mögliche Funktion des Kaliums im energieübertragenden System der Phosphorylierungsvorgänge (vgl. PIRSON 1958).

Kultur von Chlorella:

Zu den Untersuchungen wurde ein Stamm von Chlorella vulgaris Beijerinck (211/11h) aus der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen verwendet. Die Stammkulturen wurden bei Raumtemperatur auf Schrägagarröhrchen angezogen, welche das nachfolgende Nährmedium nach BERGMANN mit 1,5 % Agar erhielten.

KNO_3		0,81	g
NaCl		0,47	g
NaH_2PO_4	· $2\,H_2O$	0,47	g
Na_2HPO_4	· $2\,H_2O$	0,18	g
$MgSO_4$	· $7\,H_2O$	0,25	g
$CaCl_2$	· $6\,H_2O$	0,02	g
$FeSO_4$	· $7\,H_2O$	0,001	g
$ZnSO_4$	· $7\,H_2O$	0,001	g
$MnCl_2$	· $4\,H_2O$	0,0002	g
H_2O quarzdestilliert		1000	ml

Zur Herstellung dieser Nährlösung wurden nur MERCK-Reagenzien zur Analyse verwendet. Sie zeigte einen p_H-Wert zwischen 6,3 und 6,4.

Die verschiedenen Nährlösungen für die Mangelversuche wurden entweder erhalten durch entsprechende Erniedrigung der Ausgangskonzentration des betreffenden Elements oder durch völliges Weglassen, wie im experimentellen Teil dieser Arbeit näher ausgeführt.

Zu den Versuchen wurde eine Algenprobe von einem Schrägagarröhrchen abgenommen, mehrmals mit bi-destilliertem Wasser gewaschen, wieder suspendiert und davon zur Impfung eine Probe von ungefähr $4 \cdot 10^6$ Chlorellazellen in 300 ml sterilisiertes Nährmedium einpipettiert.

Als Anzuchtgefäße für die Flüssigkeitskulturen dienten Röhren aus Schott-Glas G 20 mit ca. 450 ml Inhalt. Sie befanden sich in Lichtthermostaten, die von LORENZEN (1959) näher beschrieben worden sind. Die Konstruktion dieser Anlage ermöglicht auch die Durchführung von Versuchen bei Licht und Dunkelheit, unter verschiedener Begasung, und bei konstanter Temperatur. Zur Beleuchtung dienten vier Philips-Leuchtstoffröhren und zwar die Typen TL 40 W 1/32 und TL 40 W 1/55 gemischt im Verhältnis 1 : 1. Anzucht und Versuche wurden stets bei 25°C und einer Beleuchtungsstärke von 5000 Lux durchgeführt, wobei normalerweise die Kulturen mit einem Luft/CO_2-Gemisch (1,5 Volumen % CO_2) begast wurden. Bei den Experimenten mit CO_2-freier Luft wurde das CO_2 vorher durch konzentrierte KOH entfernt.

Chlorophyll-Bestimmung:

1 ml Algensuspension wurde zur Entfernung der Nährlösung zentrifugiert, die Algen in H_2O gewaschen und in 10 ml Methanol (96 %) zur Chlorophyllextraktion aufgenommen. Nach einstündigem Belassen bei Raumtemperatur wurde der Extrakt abgetrennt und bei 600 mμ (Schichtdicke = 1 cm) im Zeiss-Spektralphotometer vermessen. Nach COMAR und ZSCHEILE (1942) haben Chlorophyll a und b, gelöst in Äther, bei 600 mμ den gleichen Absorptionskoeffizient von 9,95, so daß wir unsere Werte für Methanol korrigieren mußten. Zu diesem Zweck ermitttelten wir einen Umrechnungsfaktor, wobei wir folgendermaßen vorgingen:

1) von einer wässrigen Suspension gewaschener Chlorella wurden 1 bis 8 ml, die verschiedenen Algenmengen und damit verschiedenen Chlorophyllmengen entsprachen, entnommen und davon Methanolextrakte hergestellt und bei 600 mμ vermessen.

2) Parallel dazu stellten wir auf gleiche Weise Methanolextrakte her, die vorsichtig in Scheidetrichter, die 10 ml Äther enthielten, überführt wurden. Das Methanol wurde quantitativ durch Zugabe und Auswaschen mit Wasser entfernt. Das nun in Äther gelöste Chlorophyll wurde sehr sorgfältig abgetrennt und in graduierte Zentrifugengläser überführt. Die letzten Spuren von Wasser konnten durch Zugabe von wasserfreiem Natriumsulfat entfernt werden. Nachdem mit Äther auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt worden war, wurde die Extinktion bei 600 mμ gemessen.

Tabelle 1 zeigt die Extinktionswerte von methanolischen Chlorophyllextrakten gegenüber den Parallelen in Äther. Aus dem Vergleich der ermittelten Werte ergab sich ein Umrechnungsfaktor von 0,83.

Tabelle 1:

ml der gleichen Chlorella-suspension	Extinktion bei 600 mμ Schichtdicke = 1 cm		Quotient
	Äther-extrakt	Methanol-extrakt	$\frac{E\ Äther}{E\ Methanol}$
1,0	0,050	0,060	0,833
2,0	0,080	0,096	0,830
3,0	0,105	0,128	0,820
4,0	0,130	0,160	0,813
5,0	0,155	0,190	0,816
6,0	0,187	0,222	0,843
7,0	0,216	0,256	0,844
8,0	0,252	0,303	0,833

Berechnung:

Die Extinktion des Methanolextraktes bei 600 mμ wurde gemessen und mit 0,83 multipliziert.
Die Gesamtchlorophyllkonzentration ergab sich dann aus

$$c = \frac{1}{\alpha \cdot d} \cdot \log \frac{I_o}{I}$$

$\alpha = 9,95$; $d = 1$; $\log \frac{I_o}{I}$ = Extinktion bei 600 mμ

nachdem alle notwendigen Verdünnungen in Rechnung gestellt worden

waren. Sie wurden bezogen auf den Gesamtstickstoff der Ausgangsmenge an Algensuspension.

Kohlenhydratbestimmung:

Die Gesamtkohlenhydrate der Chlorella bestimmten wir mit der Anthron-Methode in Anlehnung an FALES (1951) und SCHLEGEL (1956).

10 ml Anthron-Reagenz wurden mit 1 ml Algensuspension im Reagenzglas vermischt und genau 7 Min. bei 100° C im Wasserbad erhitzt (längere Erhitzungszeiten verursachten ein Nachlassen der Farbtiefe). Danach wurden die Proben mit Leitungswasser abgekühlt und die Farbtiefe bei 620 mμ als Maß für die Kohlenhydratmenge gegen eine Kontrolle gemessen, welche die gleiche Algenmenge in der entsprechenden Menge reiner Schwefelsäure (D = 1,84) enthielt.

Mit Anthron werden alle die Kohlenhydrate (einschließlich der Polysaccharide) bestimmt, welche durch Einwirken konzentrierter H_2SO_4 nach Spaltung in den Oxymethylfurfurol-Ring übergehen. Um die Anwendbarkeit der Methode zu überprüfen, wurden verschiedene Algenmengen genommen und ihre Gehalte an Kohlenhydrat bestimmt. Es zeigte sich, daß die Extinktion der entwickelten Farbe im Bereich von 0,15 bis 0,75 der Kohlenhydratmenge direkt proportional ist. Bei unseren Bestimmungen wurde stets in diesem Bereich gemessen. Die erhaltenen Werte wurden als γ -Glukose errechnet mit einem Faktor, der einer Glukoseeichkurve entnommen wurde (vgl. Abb. 1).

Anthron-Reagenz: 0,2 g Anthron (MERCK), 8 ml absoluter Äthylalkohol, 30 ml H_2O bidest und 100 ml H_2SO_4 (D = 1,84) wurden in der angegebenen Reihenfolge unter Abkühlung gemischt und in einer dunklen Flasche im Kühlschrank aufbewahrt. Das Reagenz wurde jede Woche erneuert.

Bestimmung des Gesamtstickstoffs nach Kjeldahl:

1 ml der Chlorellasuspension wurde mit 1 ml H_2SO_4 conc. (mit 5 % Phosphorsäureanhydrid) unter Zugabe einer Spatelspitze Selenreaktions-

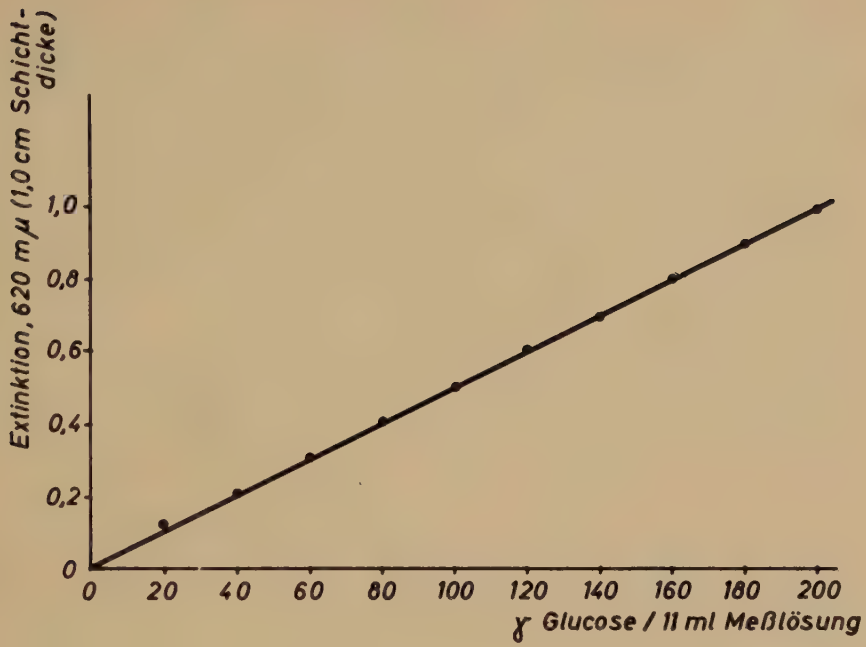

Abb. 1: Glukose-Eichkurve (Anthron-Methode)

gemisch nach Wieninger (MERCK) auf der Gasflamme in einem Kölbchen solange verascht, bis die Lösung farblos war. Die abgekühlte Lösung wurde dann in der Ganzglasapparatur zur Schnellbestimmung von Ammoniak-Stickstoff (Fa. Keiner, Hamburg) überdestilliert unter Zugabe von 5 ml Natronlauge (stickstofffrei 32 %ig, MERCK). Das Destillat fingen wir in 5 ml einer 2 %igen Borsäurelösung auf und verwendeten zur Rücktitration n/200 H_2SO_4 gegen einen Mischindikator, der aus 10 ml einer 0,1 %igen Lösung von Bromkresolgrün und 2 ml einer 0,1 %igen Lösung von Methylrot in jeweils 96 %igem Alkohol bestand.

Jede Bestimmung wurde parallel durchgeführt gegen eine Blindprobe in jeder Serie. Bei der verwendeten n/200 Schwefelsäure entsprach jeder ml 0,07 mg Stickstoff.

Bestimmung des Protein-Stickstoffs:

Wir verwendeten die Standardmethode der Proteinausfällung mit Trichloressigsäure (TES), welche von PIRIE (1955) diskutiert worden ist. Durch diese Methoden werden einige stickstoffhaltige Verbindungen z.B. Nukleinsäuren und Chlorophyll nicht entfernt, so daß sie mitbestimmt werden. Nach dem Entfernen der Nährlösung wurden 2,5 ml der Algensuspension mit 2,5 ml 10 %iger TES gemischt. Nach einer halben Stunde bei Zimmertemperatur trennten wir durch Zentrifugieren den Rückstand ab und bestimmten nach Kjeldahl den im Extrakt enthaltenen Gesamtstickstoff gegen eine Blindprobe von 5 %iger TES.

Trichloressigsäure kann durch evtl. Hydrolyse der Eiweiße teilweise Verluste hervorrufen, was von Fall zu Fall überprüft werden muß. Wie Abb. 2 zeigt, hat bei Chlorella die Dauer der Extraktionszeit keinen Einfluß auf die Menge der TES-löslichen Stickstoffverbindungen, woraus hervorgeht, daß praktisch keine Hydrolyse unter unseren Bedingungen auftritt.

Der Proteinstickstoff ließ sich als Differenz zwischen dem gesamten Kjeldahlstickstoff und dem TES-löslichen Stickstoff bezogen auf die gleichen Algenmengen berechnen.

Bestimmung der Phosphatfraktionen:

Die Phosphatbestimmungen und -fraktionierungen in dieser Arbeit sind nach PIRSON u. KUHL (1958) ausgeführt, die zur Untersuchung des Phosphathaushaltes von Hydrodictyon genauere methodische Angaben machen.

Bei unserer Aufarbeitung entnahmen wir der Versuchskultur eine bestimmte Algenmenge und befreiten sie von der anhaftenden Nährlösung durch zweimaliges Waschen auf der Zentrifuge.

Phosphatbestimmung Methode I:

Für die Phosphatbestimmungen werden die folgenden Reagenzien benötigt:

Ammoniummolybdatreagenz: 0,5 %ige Lösung von $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4\ H_2O$ in 1 n-H_2SO_4.

In einem Meßkolben werden 5 g Ammoniummolybdat (MERCK) vollständig gelöst, 26,6 ml H_2SO_4 (D = 1,84) zugefügt und nach dem Erkalten mit H_2O auf 1000 ml aufgefüllt.

Ascorbinsäure-Lösung: 0,5 %ige Lösung von Ascorbinsäure (p.A. MERCK) in H_2O.

Diese Lösung wurde nur drei Tage verwendet. Zur Phosphatbestimmung pipettierten wir nacheinander in ein Reagenzglas:

1 ml phosphathaltige Lösung
3 ml Ammoniummolybdatreagenz
1 ml Ascorbinsäurelösung

Die Meßlösung wird dann genau drei Minuten (Stoppuhr!) im kochenden Wasserbad erhitzt und anschließend mit Leitungswasser auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die blaue Farbe haben wir im Spektralphotometer der Firma CARL ZEISS bei 720 mμ und 1 cm Schichtdicke gegen eine gleichbehandelte

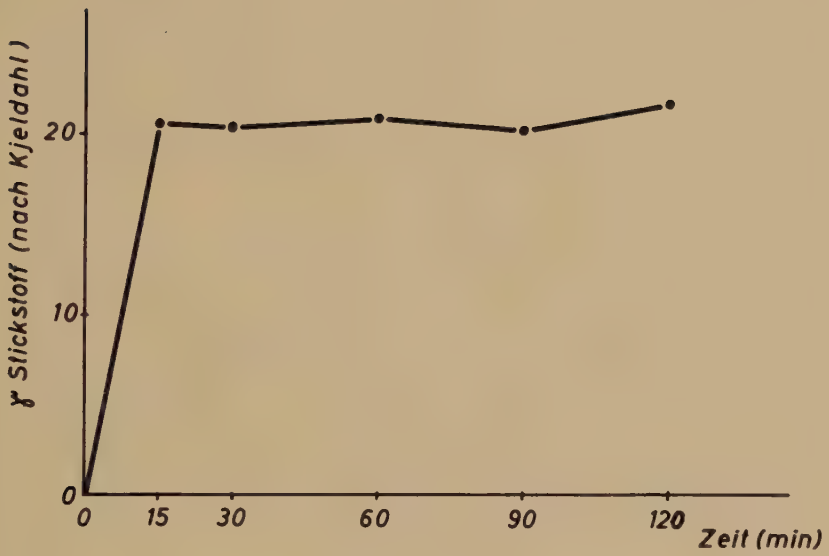

Abb. 2: Einfluß der Extraktionsdauer auf die Menge des gesamten TES-löslichen Stickstoffs, Extraktionslösung = 5 %ig an TES

Blindlösung vermessen. In dieser war die phosphathaltige Lösung durch 1 ml 3 n-H_2SO_4 ersetzt.

Die 3 n-H_2SO_4 entspricht der Konzentration der phosphathaltigen Lösung, wie sie nach der Veraschung der Chlorellasuspension vorliegt.

Den Phosphatwert errechneten wir über eine entsprechende Eichkurve (siehe Abb. 3).

Bestimmung des Gesamtphosphors:

1 ml Chlorellasuspension wurde mit 0,4 ml H_2SO_4 (D = 1,84) auf der Gasflamme verascht. Zur restlosen Oxydation des organischen Materials fügten wir jeweils nach dem Erkalten zweimal einige Tropfen Wasserstoffsuperoxyd (Perhydrol, MERCK) zu und erhitzten stark. Nachdem die Lösung vollkommen klar war, gaben wir 3 - 4 ml Wasser zu und kochten kräftig auf, um sicher zu sein, daß alles Phosphat in der Orthoform vorlag. Diese Lösung überführten wir quantitativ in einen kleinen Meßzylinder und füllten mit Wasser auf 5 ml auf. Ein ml davon verwendeten wir zur Phosphatbestimmung nach Methode I.

Extraktion mit Trichloressigsäure:

In ein graduiertes Zentrifugenglas gaben wir gleiche Teile (4 ml) einer Chlorellasuspension und einer eiskalten (3 - 5°C) 10 %igen Trichloressigsäurelösung. Die Mischung kam dann für 15 Min. in einen Kühlschrank, was ausreichend war, um alle löslichen Phosphorverbindungen zu extrahieren (siehe Abb. 4).

Nach Beendigung der Extraktion wurde der Rückstand durch scharfes Zentrifugieren vom klaren Extrakt abgetrennt und im Extrakt unmittelbar anschließend die Phosphatbestimmungen vorgenommen.

Bestimmung des anorganischen Phosphats:

Da bei Verwendung von Ascorbinsäurelösung als Reduktionsmittel wegen

der erforderlichen Erhitzung die Gefahr der Hydrolyse leicht spaltbarer Phosphatverbindungen groß ist, haben wir sie zur Bestimmung von anorganischem Phosphat durch eine Eisen-II-sulfatlösung ersetzt. (Methode II). Sonst blieb die Zusammensetzung der Meßlösung unverändert.

Eisen-II-sulfatreagenz: 5 %ige Lösung von $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ in 0,5 n H_2SO_4. Diese Lösung ist erst 24 Stunden nach dem Ansetzen gebrauchsfertig und muß alle zwei Tage erneuert werden.

Bei dieser Methode entwickelt sich die blaue Farbe langsam bei Raumtemperatur und wird genau nach 20 min. gegen eine Blindprobe (1 ml 5 %ige TES anstelle des phosphathaltigen Extraktes) bei 720 mμ gemessen. Über eine Eichkurve (siehe Abb. 5) ergaben sich die Phosphatwerte.

Bestimmung des gesamten säurelöslichen Phosphats:

1 ml TES-Extrakt wurde verascht (siehe Gesamtphosphat) und danach in der klaren Lösung nach Methode I der Phosphatgehalt bestimmt.

Bestimmung der labilen Phosphate im TES-Extrakt:

2 ml des TES-Extraktes kamen in einem Reagenzglas zu der gleichen Menge 2 n-HCl, so daß die Endkonzentration an HCl 1n war. Das Reagenzglas wurde dann für genau 7 min. im kochenden Wasser erhitzt und anschließend auf Zimmertemperatur abgekühlt.

1 ml dieses hydrolysierten TES-Extraktes diente zur Bestimmung des Phosphats nach Methode I (Blindlösung = 1 n HCl). Bestimmt wurden so anorganisches Orthophosphat und die Phosphate, welche durch o.a. Behandlung abgespaltet worden waren (siehe LINDBERG u. ERNSTER 1956). In unserem Falle waren 7 min. Hydrolysezeit völlig ausreichend, um alle labilen Phosphatverbindungen im Chlorella-TES-Extrakt abzuspalten, wie Abb. (6) zeigt. Die Mengendifferenz zwischen der hydrolysierten Fraktion im TES-Extrakt und dem anorganischen Orthophosphat besteht aus dem sog. "7 Minuten-Phosphat", welches die labilen Phosphate und die energiereichen P-Verbindungen enthält. In diese Kategorie gehören

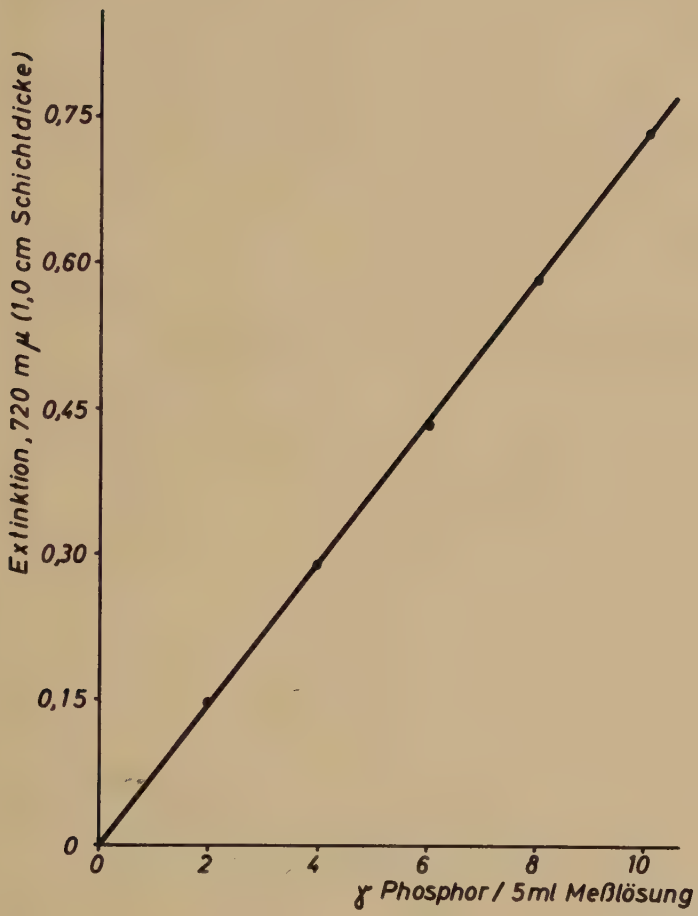

Abb. 3: Phosphateichkurve für Methode I

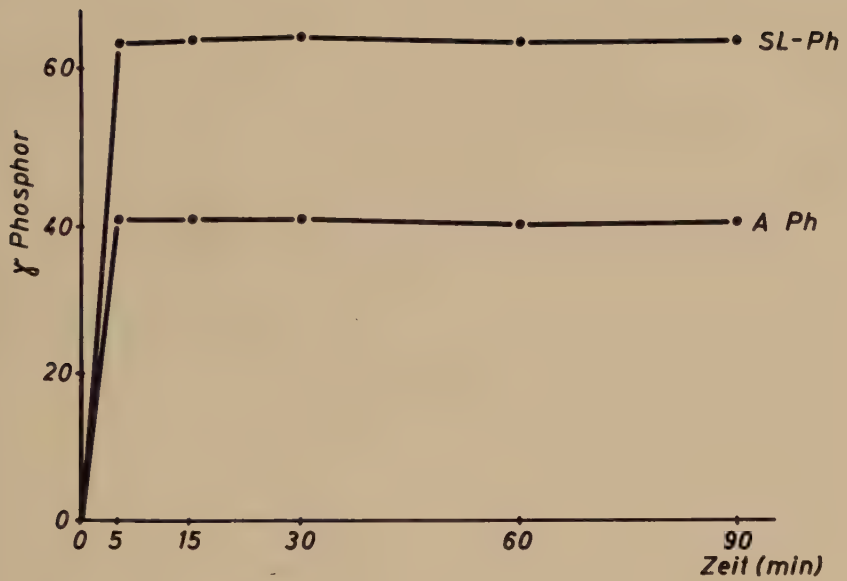

Abb. 4: Einfluß der Extraktionsdauer auf die Menge der gesamten säurelöslichen Phosphate (Sl-Ph) und die Menge des extrahierbaren anorganischen Orthophosphats (APh)

Extraktionslösung: 5 %ig an TES

Temperatur: 3 - 5 °C

Die dargestellten Werte beziehen sich auf zwei verschiedene Materialproben mit unterschiedlichem Ausgangsgehalt.

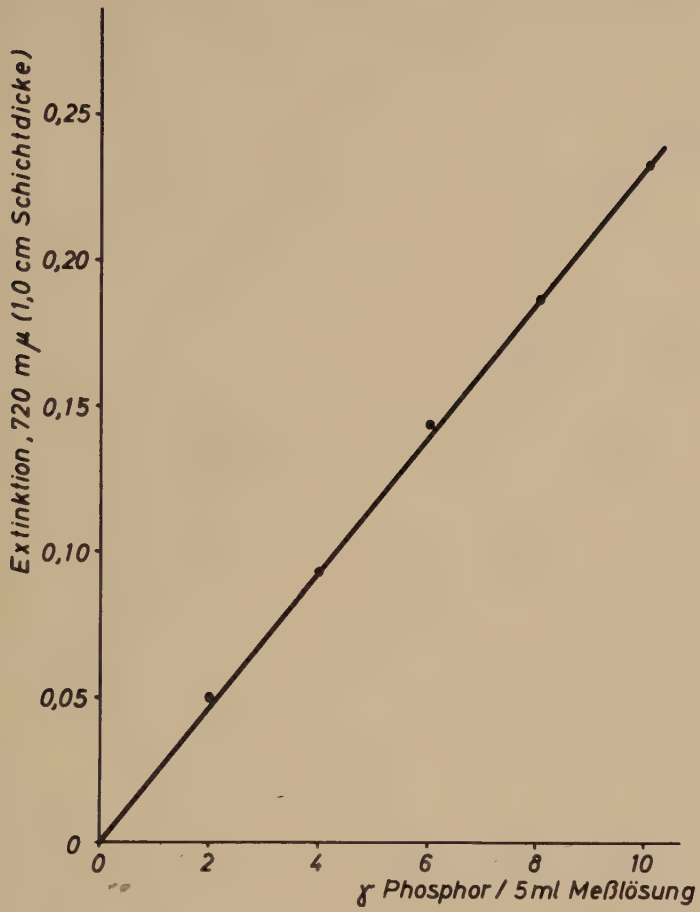

Abb. 5: Phosphateichkurve für Methode II

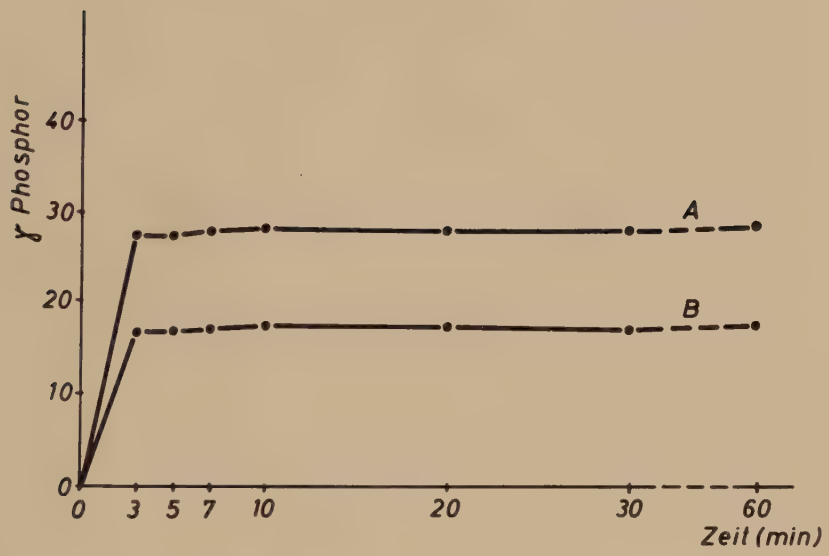

Abb. 6: Einfluß der Hydrolysezeit auf die Menge des aus labilen Verbindungen freigesetzten Orthophosphats (100°C; 1 n HCl)

A: Algen (TES unbehandelt)

B: TES-Extrakt

Die dargestellten Werte beziehen sich auf zwei verschiedene Materialproben.

die gebundenen Phosphate im ATP und ADP, die in Algen von ALBAUM und Mitarb. und SCHWINCK nachgewiesen sind.

Bestimmung der TES-löslichen, stabilen organischen Phosphate:

Diese Fraktion konnte als Differenz zwischen den Werten für das gesamte säurelösliche Phosphat und der Summe von anorganischem und labilem säurelöslichen Phosphat errechnet werden.

Nach LINDBERG und ERNSTER enthält diese Fraktion die Phosphatester wie: Glukose-6-Phosphat, Ribose-5-Phosphat, Glyzerinphosphat, Adenosin-5-Phosphat und andere.

Bestimmung des säureunlöslichen Phosphats:

Nach SCHNEIDER (1945) sind in dieser Fraktion enthalten:

1. Phospholipide
2. Phosphoproteide
3. Nucleinsäuren
4. säureunlösliche Polyphosphate
   (WIAME 1949 und WINTERMANS 1955)

Der Wert dieser Fraktion wurde als Differenz zwischen dem Gesamtphosphat und dem gesamten, säurelöslichen Phosphat errechnet. Die säureunlösliche Fraktion wurde weiter aufgearbeitet zur Bestimmung der:

A. TES-unlösliche, labile Phosphate:

2 ml der Chlorellasuspension wurden zu 2 ml 2 n-HCl in ein Zentrifugenglas gegeben und in kochendem Wasser genau 7 Min. erhitzt. Diese Zeit war ausreichend, um alle labilen P-Verbindungen aufzuspalten, denn eine Verlängerung der Zeit brachte keine Zunahme der freigesetzten P-Menge (siehe Abb. 6). Der Rückstand nach der Hydrolyse wurde durch Zentrifugation abgetrennt und der Phosphatgehalt des klaren Überstandes nach Methode I bestimmt (Blindlösung = 1 n-HCl).

Der so erhaltene P-Wert setzt sich aus den Werten des anorganischen Orthophosphats, TES-löslichen labilen Phosphats und TES-unlöslichen labilen Phosphats, zusammen.

Von diesem Gesamtwert wurden die Werte für anorganisches Orthophosphat und TES-lösliches labiles Phosphat subtrahiert, so daß sich die Fraktion der säureunlöslichen labilen Phosphate ergab. Diese Fraktion entspricht der von WINTERMANS (1955), der aus Chlorella durch Extraktion mit schwacher Alkalilösung nach vorausgegangener TES-Extraktion sie gewinnen konnte. Die in ihr enthaltenen P-Verbindungen stellen anorganische Polyphosphate dar.

B. TES-unlösliche stabile organische Phosphate:

In dieser Fraktion sind neben anderen Verbindungen die Nucleinsäuren enthalten. Die Menge läßt sich als Differenz zwischen der Gesamtmenge der TES-unlöslichen Phosphate und den unlöslichen "7-Minuten-Phosphaten" ermitteln.

Die Verhältnisse zwischen den verschiedenen Phosphatfraktionen normal angezogener Chlorellazellen, analysiert nach den angegebenen Methoden und berechnet nach dem Schema von PIRSON u. KUHL (1958) sind in Abb. (7) angegeben.

Abb. 7: Die Phosphatfraktionen bei Chlorella vulgaris (Normal-Anzucht)

Für alle Darstellungen in der gleichen Art gilt:

APh = anorganisches Orthophosphat
SL-StoPh = säurelösliches, stabiles organisches Phosphat
SL-7 Ph = säurelösliches "7 min"-Phosphat
SL-Ph = TES-lösliches Phosphat
SU-Ph = TES-unlösliches Phosphat
SU-7 Ph = säureunlösliches,"7 min"-Phosphat
SU-StoPh = säureunlösliches, stabiles organisches Phosphat
G-Ph = Gesamtphosphat
G-7 Ph = gesamtes "7 min"-Phosphat

Die Trennung zwischen säurelöslichen und säureunlöslichen P-Fraktionen wurde durch einen über den linken Säulenrand hinausgehenden Strich dargestellt.

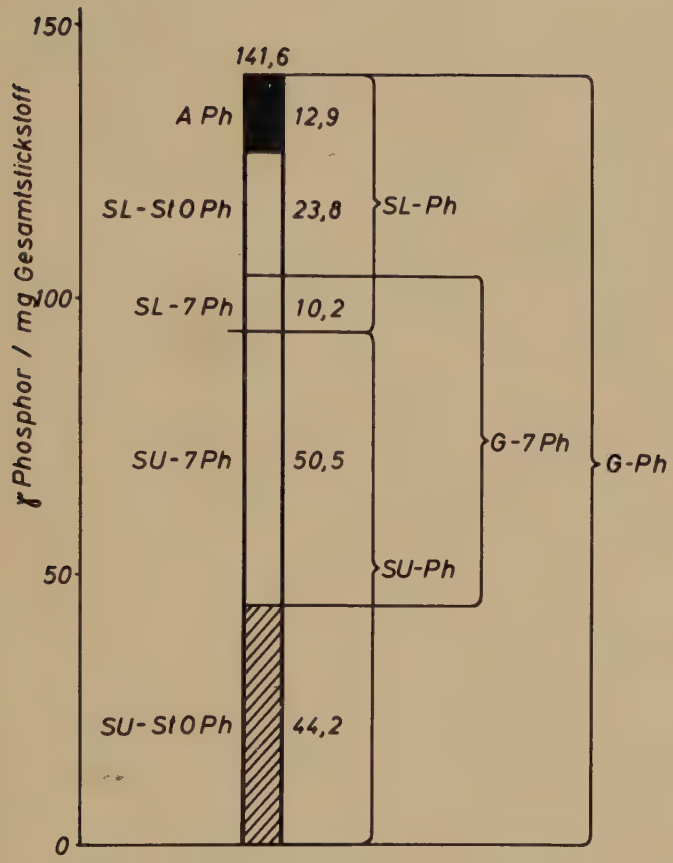
150
100
50
0
γ Phosphor / mg Gesamtstickstoff
141,6
A Ph
12,9
SL-St0 Ph
23,8
SL-Ph
SL-7 Ph
10,2
SU-7 Ph
50,5
G-7 Ph
G-Ph
SU-Ph
SU-St0 Ph
44,2

Abb. 7

A. Wachstum, Kohlenhydratgehalt, Protein und Chlorophyll bei Chlorella in Mineralsalzmangel

I. Kaliummangel

Chlorella wurde in Nährlösungen mit drei verschiedenen Anfangskonzentrationen von $8 \cdot 10^{-3}$, $2 \cdot 10^{-5}$ und $8 \cdot 10^{-6}$ mol KNO_3 kultiviert; die Kulturen sind nachstehend mit N_0 (Normalkultur) bzw. K_I (geringer Mangelgrad) und K_{II} (mittlerer Mangelgrad) bezeichnet worden. KNO_3 wurde in den K-Mangellösungen durch aequivalente Mengen von $NaNO_3$ ersetzt. Zu Beginn des Versuchs wurden gleiche Volumina der Chlorella-Abimpfung in die drei oben genannten Kulturmedien übertragen. Wachstum, Gesamt-Kohlenhydrate-, Protein- und Chlorophyllgehalt der drei Kulturen wurden während 14 Tagen, in denen sie unter den gleichen Licht-, Durchlüftungs- und Temperaturbedingungen wuchsen, miteinander verglichen.

In dieser Untersuchung sind die erhaltenen Analysenwerte aus folgendem Grunde auf den Gesamtkjeldahlstickstoff der Algen bezogen:

Bei Mangelkulturen verhalten sich Trockengewicht und Gesamtstickstoff im Verlauf der Zeit verschieden (vgl. Abb. 8).

Bei Veränderungen im Kohlenhydratgehalt können die Unterschiede im Trockengewicht größer sein als diejenigen im Gesamtstickstoff.

Als Maß für das Wachstum der drei Kulturen galt die Änderung des Gesamt-Stickstoffgehalts (Kjeldahl-N) pro ml Algensuspension, während die Daten für den Gesamtkohlenhydrat-, Protein- und Chlorophyllgehalt γ/mg Gesamt-N der Zellen ausgedrückt wurden. Um jede Änderung in der Höhe des Kohlenhydratgehalts der Zellen während des Wachstums unabhängig von ihrem N-Gehalt verfolgen zu können, wurden die absoluten Werte als γ/Gesamtkohlenhydrate pro ml Algensuspension angegeben.

Gesamtstickstoff der Algen pro ml Suspension (Wachstumsverlauf)

Abb. (8) stellt die Wachstumskurven sowohl der Normal- wie der K-Mangelkulturen von Chlorella dar. Mangelkulturen weisen im allgemeinen von Anfang an eine niedrigere Wachstumsrate auf im Vergleich zur normalen, welche eine ungefähr lineare Wachstumskurve zeigt. Wachstumsverzögerung erfolgt bei K_I und K_{II}, wenn man die Kaliummenge in den Nährlösungen verringert.

Die Zufügung von K-Ionen (geboten als KCl in der normalen Dosis) zu den Mangelkulturen hatte am nächsten Tage eine Zunahme des Kjeldahl-N zur Folge. Diese Zunahme erklärt sich aus einer Wachstumsrestitution der Mangelkulturen, wobei die Wachstumsrate im ferneren Verlauf die gleiche bleibt und mit der der Normalkultur parallel läuft.

Diese den Einfluß des Kaliums auf das Wachstum autotropher Chlorella-Kulturen betreffenden Ergebnisse stehen im allgemeinen im Einklang mit denjenigen, die PIRSON et. al.(1952) mit autotrophen Kulturen von Ankistrodesmus erzielten. die entweder Nitrat oder Ammonium als Stickstoffquelle erhielten, wie auch mit denen von BERGMANN (1955) bei heterotrophen und mixotrophen Kulturen von Chlorella. Dies weist darauf hin, daß der Mangel an Kalium das Wachstum unabhängig von der Art der Kultur der Alge und der gebotenen Stickstoffquelle hemmt.

Eine Wachstumsverzögerung infolge von K-Mangel wurde auch bei Lemna (PIRSON und SEIDEL 1950; BIERHUIZEN 1954) und bei Hydrodictyon (NEEB 1952) beobachtet.

Gesamt-Kohlenhydrate

In Abb. (9) sind die Änderungen im Gesamtkohlenhydratgehalt pro ml Algensuspension in Beziehung zum Mangelgrad dargestellt.

Mangelkulturen haben einen höheren Kohlenhydratgehalt als normale; dies ist jedoch charakteristisch nur für frühe Mangelstadien. In späteren Stadien, wenn die K-Ionen völlig verbraucht sind, findet

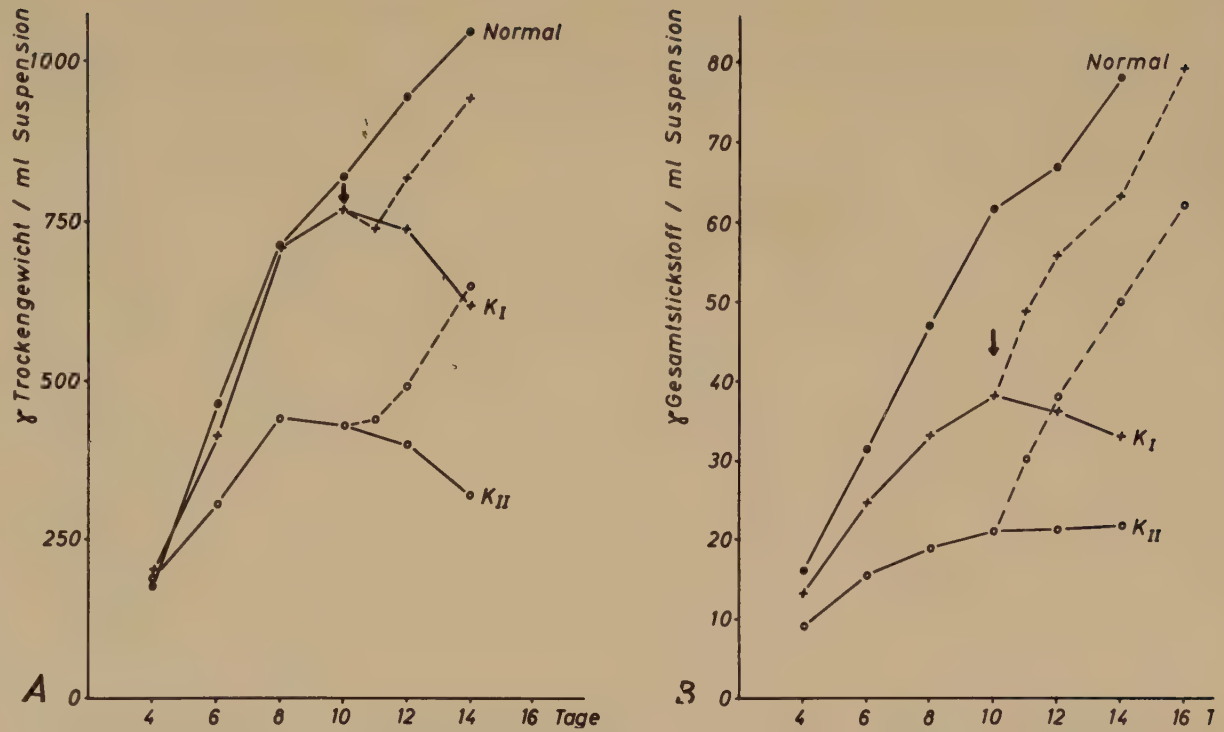

Abb. 8: Verhalten des Trockengewichts (A) und Gesamtstickstoffs der Algen (B) bei Normalkultur und Kaliummangelkulturen im Dauerlicht.

Für diese und die folgenden Darstellungen gilt:

K_I = geringer Kaliummangel ($2 \cdot 10^{-5}$ mol KNO_3)

K_{II} = mittlerer Kaliummangel ($8 \cdot 10^{-6}$ mol KNO_3)

Der Pfeil bezeichnet die Zugabe von Kalium (Normaldosis) zu einer Parallelmangelkultur. Die gestrichelten Kurven geben das Verhalten während der Erholungsphase wieder.

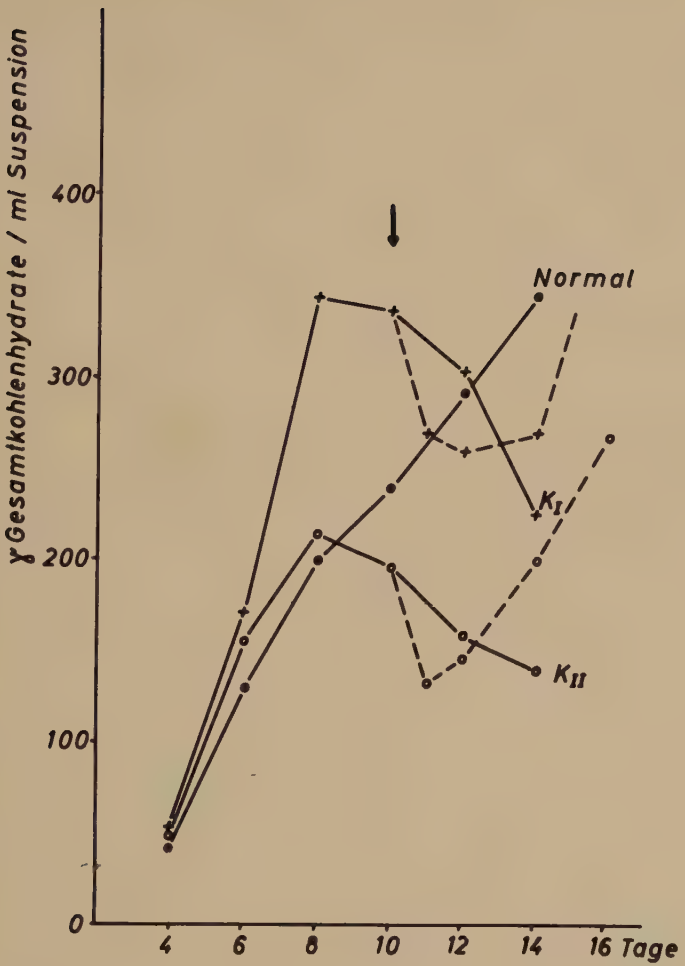

Abb. 9: Verhalten der Gesamt-Kohlenhydrate der Algen bei Normalkultur und Kaliummangelkulturen im Dauerlicht

eine kontinuierliche Abnahme statt. Somit enthält die Normalkultur bei Versuchsende schließlich mehr Kohlenhydrate als die Mangelkulturen.

Die anfängliche Zunahme des Kohlenhydratgehalts von Mangelkulturen ist in der geringeren Mangelstufe (K_I) bedeutender als in der mittleren (K_{II}), was besagt, daß eine solche Zunahme von der anfänglich in der Mangelkultur vorhandenen Kaliummenge abhängig ist.

Die Zugabe von KCl zu den Mangelkulturen bewirkt eine genau einen Tag später erfolgende rasche Abnahme der Kohlenhydrate. Dieser folgt wieder Zunahme, die anfangs relativ gering ist, aber später die Rate der Normalkultur erreicht.

Das Verhältnis der Gesamt-Kohlenhydrate zu ihrem Gesamt-Stickstoff (C/N) ist in Abb. (10) dargestellt. In der normalen Chlorella-Kultur ist das C/N-Verhältnis nach dem 6. Versuchstag fast dasselbe geblieben, was für ein Gleichgewicht zwischen Kohlenhydraten und Stickstoff spricht. Das Gleichgewicht bleibt bestehen, sofern die Zelle einem normalen Stoffwechsel unterliegt. Bei den K-Mangelzellen erfährt das C/N-Verhältnis während des Versuchs dauernde Veränderungen, was von einer Störung ihres Stoffwechselablaufs zeugt. Beide Mangelkulturen haben im Vergleich zur Normalkultur höhere, nach dem 8. Versuchstage stufenweise absinkende C/N-Werte. Dies könnte durch die verzögerte Ausnutzung der Kohlenhydrate zu Beginn des Mangelstadiums und eine daran anschließende starke Einschränkung ihrer Synthese erklärt werden. Die Änderung des C/N-Verhältnisses in späteren Mangelstadien wird der Abnahme der Kohlenhydrate und nicht der des Stickstoffs zugeschrieben; denn aus Abb. (8) geht hervor, daß der Gesamt-Stickstoffgehalt pro ml Algensuspension in K_{II} fast konstant bleibt und sich in K_I nur wenig ändert. Die anfängliche Anhäufung der Kohlenhydrate in den K-Mangelkulturen scheint das Resultat der Verzögerung in der Ausnutzung der Kohlenhydrate zu sein, welche bei mittlerem Mangelgrad bedeutender ist als bei geringerem. Daher werden in K_{II} relativ mehr Kohlenhydrate angehäuft als in K_I.

So konnte festgestellt werden, daß K-Mangel zur Verzögerung in der Ausnutzung und Synthese der Kohlenhydrate führt. Das Ausmaß derselben ist bei beiden Prozessen abhängig von Grad und Dauer des Mangelzustandes.

Durch Zugabe von KCl zu den Mangelkulturen wurde das Verhältnis C/N normalisiert und der normale Stoffwechsel wieder hergestellt. Wenn wir die Wirkung des Kaliums in den Abb. (9 und 8) betrachten, so geht daraus hervor, daß die Abnahme der Kohlenhydrate pro ml Algensuspension mit einer Zunahme des Stickstoffgehalts in demselben Volumen der Algensuspension einhergeht. Das besagt, daß das zugegebene Kalium die angehäuften Kohlenhydrate mobilisiert und ihre Ausnutzung aktiviert hat.

Die von zahlreichen Forschern mitgeteilten analytischen Daten über Mineralsalzmangel bei höheren Pflanzen sind von STEINBERG (1953) verglichen worden. Was den Kohlenhydrat-Stoffwechsel der K-Mangelpflanzen anbetrifft, so wird von einer Zunahme der reduzierenden Zucker berichtet, verbunden mit einer nur geringen Änderung des Gesamt-Kohlenhydratgehalts. In einzelnen Fällen treten Ausnahmen und Widersprüche auf. Noch nicht sicher bekannt war bisher, daß die anfängliche Anhäufung der Kohlenhydrate ein frühes Symptom des Mangels darstellt, welches ihrer Abnahme vorausgeht; unsere K-Mangel-Versuche mit Chlorella haben diese Tatsache erwiesen. PIRSON (1958) betont, daß Mangelsymptome bei grünen Algen während des Wachstums in allen Zellen auftreten. Dagegen kann bei höheren Pflanzen ein Mangel anfänglich durch Transport von einer Zelle zur anderen ausgeglichen werden. Wenn diese Möglichkeit erschöpft ist, kann die Geschwindigkeit, mit der der Mangel einsetzt, so groß sein, daß frühe Stadien, die bei Algen so leicht sichtbar sind, praktisch übersehen werden.

Proteine

In Tabelle (2) ist der Protein-Gehalt sowohl von normalen wie von K-Mangelzellen zu ihrem Gesamt-N-Gehalt in Beziehung gesetzt worden. Normale Zellen, wie auch solche der geringeren Mangelstufe, haben während der ganzen Versuchsperiode etwa den gleichen Proteingehalt. Bei mittleremMangel wird in späteren Mangelstadien eine geringe Abnahme von 5-6 % des normalen Gehalts beobachtet. Diese geringe Abnahme der Proteine in K_{II} geht einher mit einer Zunahme des löslichen organischen (und anorganischen) Stickstoffs der Zellen. Da der Gesamt-Stickstoffgehalt der Algensuspension zu dieser Zeit annähernd konstant bleibt (siehe Abb. 8), liegt offenbar Proteolyse vor. Diese setzt ein, wenn der Kohlenhydratgehalt der Algensuspension einen niedrigen Stand erreicht,

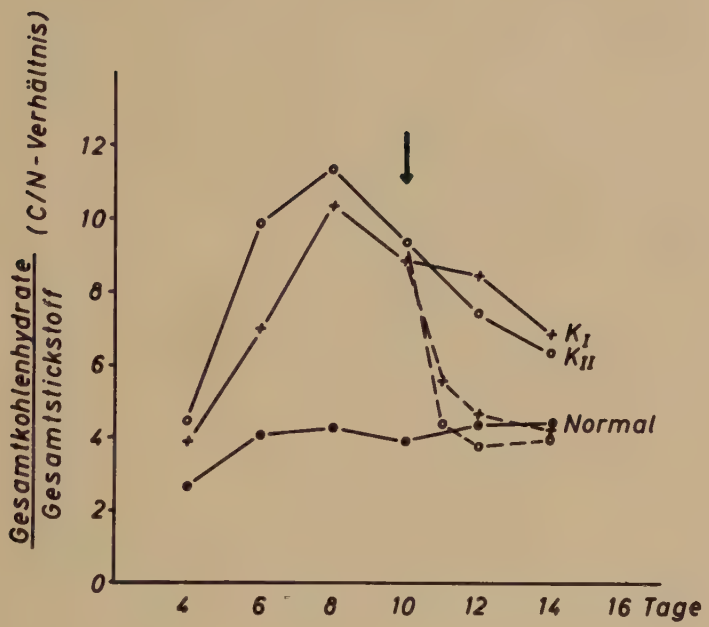

Abb. 10: Verhalten der Gesamt-Kohlenhydrate bezogen auf Gesamtstickstoff der Algen (C/N-Verhältnis) bei Normalkultur und Kaliummangelkulturen im Dauerlicht

Tabelle 2:

Verhalten von Protein-Stickstoff und löslichem Stickstoff bei normalen Zellen und K-Mangelzellen im Dauerlicht
Bezugsgröße = mg Algengesamtstickstoff nach Kjeldahl
Für diese und die folgenden Tabellen gilt:

K_I = geringer Mangel ($2 \cdot 10^{-5}$ mol KNO_3)
K_{II} = mittlerer Mangel ($8 \cdot 10^{-6}$ mol KNO_3)

Tage nach Versuchsbeginn		4	6	8	10	12	14	11	12	14
Normal	γ Protein-N	896	886	900	893	880	860	nach Zugabe von Kalium (in normaler Dosis) am 10. Versuchstag		
	γ löslicher-N	104	114	100	107	120	140			
Mangel K_I	γ Protein-N	880	885	905	906	902	880	896	900	887
	γ löslicher-N	120	115	95	94	98	120	104	100	113
Mangel K_{II}	γ Protein-N	896	880	860	840	850	835	883	897	877
	γ löslicher-N	104	120	140	160	150	165	117	103	123

was in späteren Stadien mittleren Mangels offensichtlich der Fall ist. Die relativ langsame Zunahme des Gesamt-N-Gehaltes pro Volumen der Algensuspension zu Beginn des Mangelstadiums ist nicht von einer Anreicherung des löslichen Stickstoffs begleitet. Aus dem Verhalten des löslichen N- und des Proteingehalts der Mangelzellen geht hervor, daß beide N-Fraktionen in gleichem Maße von Kalium beeinflußt werden; mit anderen Worten, beide Fraktionen heben sich in demselben Maße ab wie der Gesamt-Stickstoff der Algensuspension verringert.

Die Zugabe von KCl zu den Mangelkulturen erhöhte in diesen Versuchen sowohl den löslichen Stickstoff als auch den Proteingehalt. Die rasch erfolgende Zunahme wurde am folgenden Tage durch Messen des Stickstoffgehalts pro ml Algensuspension ermittelt.

Chlorophyll

Mangelkulturen zeigen von Anfang an einen im Vergleich zu dem der Normalkulturen verminderten Chlorophyllgehalt. Bei anhaltendem Mangel schreitet die Chlorophyllabnahme fort und erreicht bei Versuchsende in der geringeren und mittleren Mangelstufe Werte von 44 bzw. 33% der normalen (vgl. Tabelle 3).

Ein Vergleich des Chlorophyllgehalts der Mangelzellen mit ihrem Wachstum zeigt folgendes: Während das Wachstum zu Beginn des Mangelstadiums nur relativ langsam fortschreitet, ist die Chlorophyllsynthese anscheinend stark verzögert, und das Verhältnis von Chlorophyll zu Gesamt-Stickstoff nimmt fortschreitend ab. Nach 10 Tagen hat das Wachstum völlig aufgehört, was besagt, daß die Abnahme des Chlorophyllgehalts in späteren Mangelstadien auf Abbau des Chlorophylls zurückzuführen ist. Vergleicht man andererseits den Chlorophyllgehalt mit dem Proteingehalt der Zellen während des Mangelstadiums, so findet man, daß die Chlorophyllabnahme nicht mit einer Proteinverminderung einherzugehen braucht. In der geringeren Mangelstufe bleibt der Proteingehalt innerhalb der Versuchszeit ungefähr derselbe und gleicht dem der Normalkultur, während der Chlorophyllgehalt abnimmt. Gleiches gilt auch für frühe Stadien (bis zum 6. Tage) mittleren Mangels. In späteren Stadien desselben nehmen sowohl Chlorophyll als auch Proteine ab, was auf Proteolyse und Chlorophyllzersetzung infolge von strukturellen Störungen zurückgeführt wird.

Tabelle 3:

Verhalten des Gesamtchlorophylls bei normalen Zellen und K-Mangelzellen im Dauerlicht.

γ Chlorophyll/mg Gesamtstickstoff nach Kjeldahl

Tage nach Versuchsbeginn	4	6	8	10	12	14	11	12	14
Normal	470	500	535	495	517	546	nach Zugabe von Kalium (in normaler Dosis) am 10. Versuchstag		
Mangel K_I	420	355	312	322	278	240	376	400	520
Mangel K_{II}	315	265	220	225	208	178	367	435	494

Durch Wiederzufuhr von KCl wird der Chlorophyllgehalt erhöht und nimmt ständig zu, bis er den Normalwert erreicht (vgl. Tabelle 3).

In verminderten Mengen beeinflussen K-Ionen Chlorophyll und Protein verschieden stark, d.h. Chlorophyll- und Proteinsynthese werden durch die vorhandenen Kaliummengen nicht zur gleichen Zeit in demselben Maße beeinflußt. Würden die vorhandenen K-Ionen primär zur Proteinsynthese verwendet, so müßte der N-bezogene Chlorophyllgehalt abnehmen.

Die Änderungen der analytischen Daten der untersuchten Mangelzellen sind mit herabgesetzter Photosyntheseleistung verbunden, die vom Mangelgrad abhängig ist (vgl. die Ergebnisse der manometrischen Messungen von PIRSON (1937, 1939) und von PIRSON, TICHY und WILHELMI (1952) an Kulturen von Ankistrodesmus und Chlorella).

In K-Mangelzellen ist die verzögerte Photosynthese verknüpft mit einer hohen Respirationsrate, welche die angehäuften Kohlenhydrate z.T. verbraucht. Zugefügtes Kalium erhöht in kurzfristigen Versuchen die Photosyntheseleistung und erniedrigt die Respirationsrate. Die Wiederherstellung der Syntheseleistung der Zellen erfolgt im Sinne einer erhöhten Ausnutzung der Kohlenhydrate. Kalium beeinflußt also im allgemeinen sowohl die Photosynthese als auch die daran angeschlossenen synthetischen Prozesse.

II. Wirkung des Kaliums auf Kaliummangelzellen im Licht und im Dunkeln

Die Analyse der Chlorella-Zellen nach 8-tägiger K-Mangel-Kultur gibt ein Bild von dem Stand des Kohlenhydrat-, Protein- und Chlorophyllgehalts der Zellen in relativ frühen Mangelstadien. Die Daten der K-Mangel-Kulturen sind in Tabelle (4) mit den entsprechenden Werten der normalen Anzuchten zusammengestellt. Die in diesen Stadien geernteten K-Mangel-Chlorellen zeigen bei der Analyse immer wieder folgendes: Sie haben einen höheren Kohlenhydratgehalt als die normalen Zellen und ihr Chlorophyllgehalt ist bereits bedeutend erniedrigt, während ihr Proteingehalt praktisch noch unverändert ist.

Tabelle 4: Gehalt an Gesamt-Kohlenhydrat, Gesamtchlorophyll und Protein-Stickstoff bei normalen Zellen und Kaliummangelzellen nach acht Tagen Dauerlicht.
Bezugsgröße = mg Algengesamtstickstoff nach Kjeldahl.
Die fünf Werte wurden jeweils durch Analysen getrennter Kulturen erhalten.

		Absolutwerte			Werte in % der Normalkultur		
		Normal	Mangel K_I	Mangel K_{II}	Normal	Mangel K_I	Mangel K_{II}
mg Gesamt-Kohlenhydrat	1	5,1	10,3	10,3	100	179,5	195,0
	2	5,6	8,4	8,7			
	3	7,2	13,0	14,4			
	4	6,8	10,1	11,7			
	5	4,3	10,4	11,4			
Mittelwerte		5,8	10,4	11,3			
γ Gesamt-Chlorophyll	1	485	328	244	100	63,8	47,4
	2	525	324	242			
	3	480	300	250			
	4	505	352	246			
	5	535	312	220			
Mittelwerte		506	323	240			
γ Protein-Stickstoff	1	875	805	870	100	102	97,5
	2	882	910	865			
	3	900	905	870			
	4	885	908	870			
	5	900	905	860			
Mittelwerte		888	906	867			

Nunmehr wurde von den Kulturen der betreffenden Mangelgruppen eine Algenprobe für die erste Analyse entnommen. Die Chlorellasuspension wurde dann volumetrisch in vier Gruppen aufgeteilt und auf folgende Weise behandelt:

A Zwei Kulturen verblieben im Licht;
einer von beiden wurde KCl zugefügt.

B Die beiden anderen Kulturen wurden im Dunkeln gehalten und der einen ebenfalls KCl zugegeben.

Nach 6, 12, 24 und 48 Stunden wurden Proben zur Analyse der unterschiedlich behandelten Kulturen entnommen.

Gesamt-Kohlenhydrate (pro Gesamtstickstoff der Algen)

Die prozentuale Änderung des Kohlenhydratgehalts der Zellen unter der Einwirkung von Kalium im Dunkeln und im Licht ist in Abb. (11) dargestellt. Es ist daraus zu ersehen, daß im allgemeinen in allen Kulturen im Dunkeln wie im Licht eine Abnahme der Gesamt-Kohlenhydrate, jedoch in verschiedenem Ausmaß stattfindet. Bei den im Dunkeln gehaltenen Kulturen ist die Rate des Kohlenhydratabbaus relativ höher als im Licht. Die Kohlenhydratwerte bei den Lichtkulturen stellen einen Nettowert zwischen dem auf- und abgebauten Kohlenhydrat dar, während sie

---

Abb. 11: Einfluß von Licht und Dunkelheit auf die prozentualen Veränderungen der Verhältnisse von Gesamt-Kohlenhydrate, Chlorophyll und Protein zu Gesamtstickstoff (Kjeldahl) der Algen bei Mangelkulturen nach Kaliumzugabe (gestrichelte Kurven).
Die prozentuale Veränderung des Gesamtstickstoffs der Algen pro ml Suspension gibt das absolute Verhalten der Bezugsgröße wieder. Das Ausgangsmaterial zu diesem Versuch bestand aus Zellen, die zuvor 8 Tage lang im Dauerlicht in zwei K-Mangelstufen angezogen worden waren (siehe S. 20).

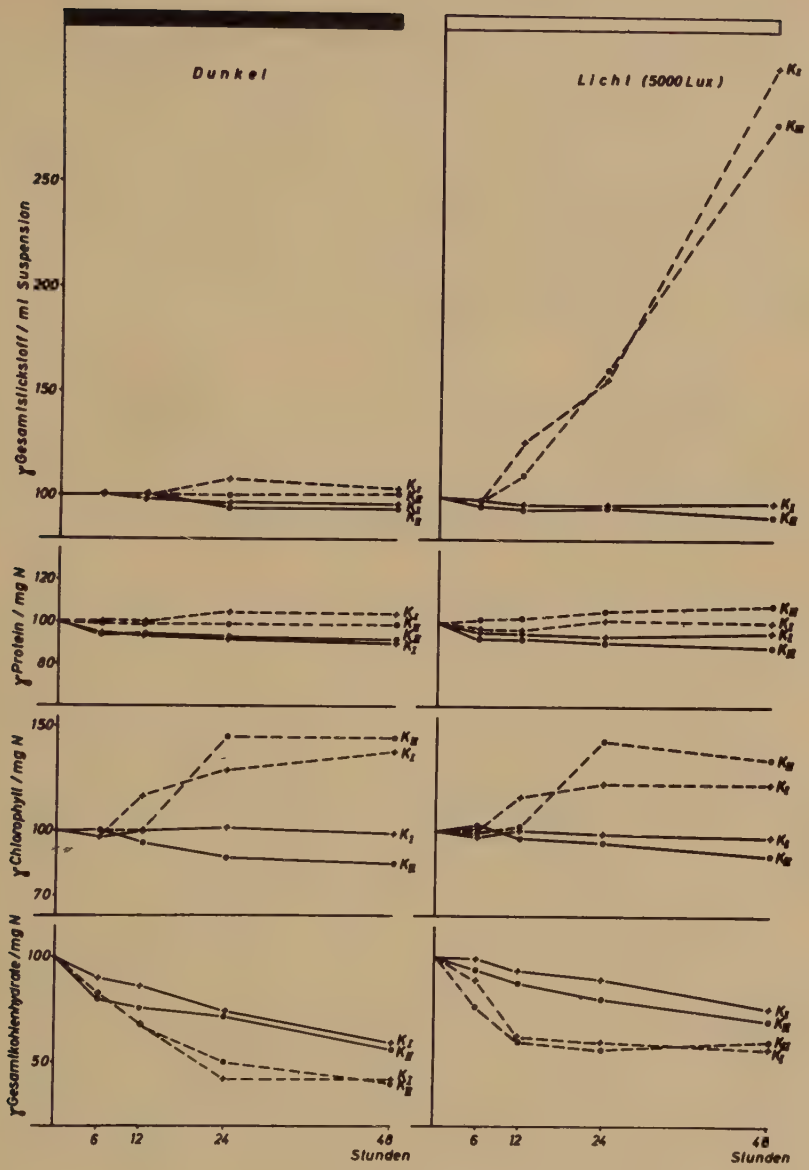
Dunkel
Licht (5000 Lux)
γ Gesamtstickstoff / ml Suspension
γ Protein / mg N
γ Chlorophyll / mg N
γ Gesamtkohlenhydrate / mg N
250
200
150
100
120
80
70
50
6
12
24
48
Stunden
K I
K II
K III

Abb. 11

im Dunkeln der vom eingesetzten Material noch vorhandenen Menge entsprechen. Die Abnahme des Kohlenhydratgehalts der Mangelzellen im Dunkeln beginnt mit einer relativ höheren Rate als im Licht und ist in der mittleren Mangelstufe ausgeprägter als in der geringeren. Darauf folgt in beiden Mangelstufen eine allmähliche Abnahme in annähernd gleichem Ausmaß, bis schließlich 41 - 44 % der anfänglichen Kohlenhydratmenge vorhanden sind. Mangelkulturen im Licht zeigen eine stufenweise Abnahme, wobei die mittlere Mangelstufe von Anfang an der geringeren voraus ist und am Ende des Versuchs Abnahmen von 30 bzw. 23,5 % erreicht werden.

Die Zufuhr von KCl zu den Mangelkulturen bewirkt eine plötzliche Abnahme ihrer Kohlenhydrate, bis es nach 12 - 24 Stunden im Licht sowohl wie im Dunkeln zu einer gewissen Konstanz kommt. So weisen die mit K behandelten Kulturen nach 12 Stunden einen stärker erniedrigten Kohlenhydratgehalt auf als die nicht mit K behandelten.

Chlorophyll (pro Gesamtstickstoff der Algen)

Die Kulturen mit mittlerem K-Mangel zeigen im allgemeinen nach 6 Stunden eine stufenweise fortschreitende Abnahme ihres Chlorophyllgehalts, welche bemerkenswerterweise im Dunkeln relativ früher beginnt als im Licht. Die Kulturen des geringeren Mangelgrades verändern den Chlorophyllgehalt praktisch nicht. Die Zugabe von K führt im Dunkeln und im Licht zur Chlorophyllbildung, die bei der niedrigeren Mangelstufe nach 6 Stunden beginnt, bei der mittleren etwas später (nach 12 Stunden).

Proteine (pro Gesamtstickstoff der Algen)

Die Veränderungen im Proteingehalt der betreffenden Kulturen werden durch Analysen entsprechender Parallelkulturen verfolgt (siehe Abb.11).

Kaliummangelkulturen zeigten sowohl im Licht als auch im Dunkeln bezogen auf den Gesamtstickstoff eine Abnahme ihres Ausgangsgehaltes an Protein. Nach Zugabe von Kalium zu diesen Mangelkulturen zeigt sich im Dunkeln praktisch keine Veränderung des Proteingehaltes. Im Licht dagegen nimmt das Protein leicht zu, wobei der Endgehalt von K_{II} ungefähr 9% über dem Ausgangsgehalt liegt, während K_I praktisch unverändert bleibt.

Gesamtstickstoff der Algen (absolut)

Die Zunahme des Gesamtstickstoffs der in 1 ml Suspension enthaltenen Algen, welche das Wachstum repräsentiert, findet vorwiegend im Licht statt. Sie beginnt 6 Stunden nach Zugabe des Kaliums zu den Mangelkulturen und schreitet im Laufe der Zeit fort. Eine geringe Zunahme des N pro ml Algensuspension ist infolge der Kaliumwirkung bei den Kulturen niedrigeren Mangelgrades im Dunkeln zu beobachten. Andererseits zeigen die nicht mit K behandelten Kulturen eine relativ geringe Abnahme im Dunkeln wie auch im Licht.

Erörterung der Befunde

Die Anreicherung der Kohlenhydrate bei mäßigem K-Mangel im Licht läßt sich auf einfache Weise damit erklären, daß die Verwertung von Kohlenhydraten als Baumaterial in der Zelle in starkem Maße beeinträchtigt ist und daher das Rohmaterial weitgehend und unverwertet in der Zelle liegenbleibt. Dieser Kaliummangeleffekt ist so ausgeprägt, daß auch die Verringerung der Photosynthese, d.h. der Kohlenhydratanlieferung, den Kohlenhydratspiegel nicht entscheidend beeinflußt. Ebenso wenig ist die erwiesene Steigerung der Atmung durch Kaliummangel (PIRSON u. Mitarb. 1952, DANIEL 1956) in der Lage, der Kohlenhydratanhäufung entgegenzuwirken, denn diese höhere Atmung stellt weitgehend einen energetischen Leerlauf dar. In dieser Hinsicht besteht zwischen dem Zustand des Mangels und der Wirkung der Entkuppelungsgifte sowie DNP eine gewisse Ähnlichkeit. RIPPEL u. BEHR (1932) haben schon früher die Verschlechterung des Nutzeffektes im Kohlenhydratumsatz (Ökonomischer Quotient) für heterotrophe Organismen beschrieben und DANIEL hat dies bei der oxydativen Assimilation von Chlorella im Kaliummangel aufgezeigt.

Die Zugabe von Kalium zu Kaliummangelzellen führt infolge von rasch verbesserter Kohlenhydratverwertung (Ankupplung der synthetischen Prozesse des Baustoffwechsels) rasch zu einer Senkung des Kohlenhydratspiegels im Dunkeln und sogar im Licht. Im Dunkeln sinkt der Kohlenhydratspiegel, obwohl die Atmung durch den Kaliumzusatz etwa auf die Norm herabgesetzt wird. Daß die synthetische Fähigkeit der Zellen gleichzeitig verbessert wird, geht aus der Erhöhung des Chlorophyllgehalts hervor.

Diese Beobachtung ist insofern bemerkenswert, als der Eiweißgehalt im Dunkeln kaum verändert wird. Besonders deutlich wird die Verbesserung der Kohlenhydratverwertung bei Kaliumzugabe im Licht. Obwohl die Photosynthese rasch ansteigt (PIRSON u. Mitarb.), sinkt der Kohlenhydratgehalt ab, während gleichzeitig die Wachstumsvorgänge (gemessen am Gesamtstickstoff) bald in vollen Gang kommen. Auch hier ist die neue Bildung des Chlorophylls besonders bevorzugt und überschreitet die Rate der Eiweißproduktion erheblich.

III. Vergleichsversuche mit anderen Mangelzuständen

Für die Mg-Mangelkulturen wurden Nährlösungen hergestellt, die eine Anfangs-Mg-Konzentration von 1/250 der Normallösung enthielten. Das fehlende $MgSO_4$ wurde hier durch aequivalente Mengen von Na_2SO_4 ersetzt.

Für die Mn- und Fe-Mangelkulturen wurden $MnCl_2$ bzw. $FeSO_4$ völlig aus den Normallösungen weggelassen.

Mangel- und Normalkulturen wurden jeweils mit dem gleichen Volumen der Algensuspension beimpft. Die analytischen Daten sind auf die gleiche Weise wie bei den K-Mangelversuchen wiedergegeben worden (vgl. Abb. 12, 13 und 14, auch Tab. 5 und 6).

1. Mg-Mangel

Das Wachstum wird bei dem hier vorliegenden Mg-Mangelgrad vom dritten Tage an stillgelegt. Der Gesamt-Kohlenhydratgehalt pro ml Algensuspension ist schon vom Beginn des Mangelstadiums an niedrig und nimmt im Laufe der Zeit allmählich weiter ab. Das C/N-Verhältnis ist dennoch insgesamt viel höher als in der Normalkultur. Zu Anfang zeigt es einen raschen und nur einen Tag dauernden Anstieg, welchem dann eine ständige Abnahme folgt.

Die Begünstigung der Kohlenhydrate gegenüber dem Gesamtstickstoff, obwohl ihre Synthese von Anfang an verzögert und später stillgelegt wird,

Tabelle 5:

Verhalten von Protein-Stickstoff und löslichem Stickstoff bei normalen Zellen und von Magnesium-, Mangan- und Eisen-Mangelzellen im Dauerlicht

Bezugsgröße = mg Algengesamtstickstoff nach Kjeldahl

Tage nach Versuchsbeginn		3	4	5	6	7	9	7	9
Normal	γ Protein-N	904	910	910	903	880	870	nach Zugabe des fehlenden Elements (in normaler Dosis) am 6. Versuchstag	
	γ löslicher-N	96	90	90	97	120	130		
Mg-Mangel	γ Protein-N	840	830	800	750	700	720	810	890
	γ löslicher-N	160	170	200	250	300	280	190	110
Mn-Mangel	γ Protein-N	900	904	904	912	908	883	902	905
	γ löslicher-N	100	96	96	88	92	117	98	95
Fe-Mangel	γ Protein-N	890	895	895	870	873	843	900	910
	γ löslicher-N	110	105	105	130	127	157	100	90

Tabelle 6:

Verhalten des Gesamtchlorophylls bei normalen Zellen und von Magnesium-, Mangan- und Eisen-Mangelzellen im Dauerlicht.

γ Chlorophyll/mg Gesamtstickstoff nach Kjeldahl

Tage nach Versuchsbeginn	3	4	5	6	7	9	7	9
Normal	372	432	456	463	440	472	nach Zugabe des fehlenden Elements (in normaler Dosis) am 6. Versuchstag	
Mg-Mangel	130	130	120	128	128	123	345	290
Mn-Mangel	362	473	390	390	405	273	387	195
Fe-Mangel	274	312	165	126	132	67	490	705

ist, offensichtlich der starken Beeinträchtigung ihrer Ausnutzung zuzuschreiben.

Die Zellen weisen eine ständige langsame Abnahme ihres Proteingehalts auf, der in späteren Mangelstadien etwa 80 % des normalen beträgt. Dagegen nimmt der gesamte lösliche Stickstoff offensichtlich infolge von Proteolyse zu. Die Chlorophyllbildung wird schon von Mangelbeginn an stark gehemmt.

Die Zugabe von $MgSO_4$ zu den Mangelkulturen führte nicht unmittelbar (d.h. nicht schon nach einem Tage) zur Wiederherstellung des Wachstumsvermögens und des Kohlenhydratgehalts der Algensuspension, wie es bei den entsprechenden K-Mangelversuchen der Fall ist. Chlorophyll und Proteine dagegen reagierten rascher auf die Mg-Wirkung; sie nahmen schon nach einem Tage zu. Darauf folgte am nächsten Tage eine Erhöhung des Stickstoff- und Kohlenhydratgehalts pro ml Algensuspension mit Einstellung des normalen C/N-Verhältnisses. Der normale Proteingehalt und die normale Wachstumsrate waren am 3. Tage völlig erreicht. Zugleich wurde ein verminderter Chlorophyllgehalt der Algenzellen gemessen, wohl infolge der stärkeren Zunahme des Stickstoffs.

Die verzögerte Wirkung des Mg im Vergleich zur unmittelbaren des K in "Erholungs"versuchen zeugt von dem unterschiedlichen Einfluß der beiden Elemente auf die Stoffwechselvorgänge.

PIRSON (1937) und PIRSON u. Mitarb. (1952) haben gezeigt, daß die infolge von Mg-Mangel gehemmte Photosynthese nach Wiederzugabe von Mg in kurzfristigen Versuchen nicht reversibel sei. Die Ursache hiervon sollen tiefgehende strukturelle Störungen in den Zellen sein, wofür auch die von uns mitgeteilten Daten sprechen.

2. Mn-Mangel

Hier kommt es erst nach dem 5. Tage zum Wachstumsstillstand. Bemerkenswert ist die Armut der Zellen an Kohlenhydraten vom Beginn des Mangelzustandes an. Der Wert für das C/N-Verhältnis liegt anfangs im normalen Bereich. Am nächsten Tag erfolgt eine rasche Abnahme bis zu einem für den Mangelzustand bezeichnenden Niveau. Bei vermindertem

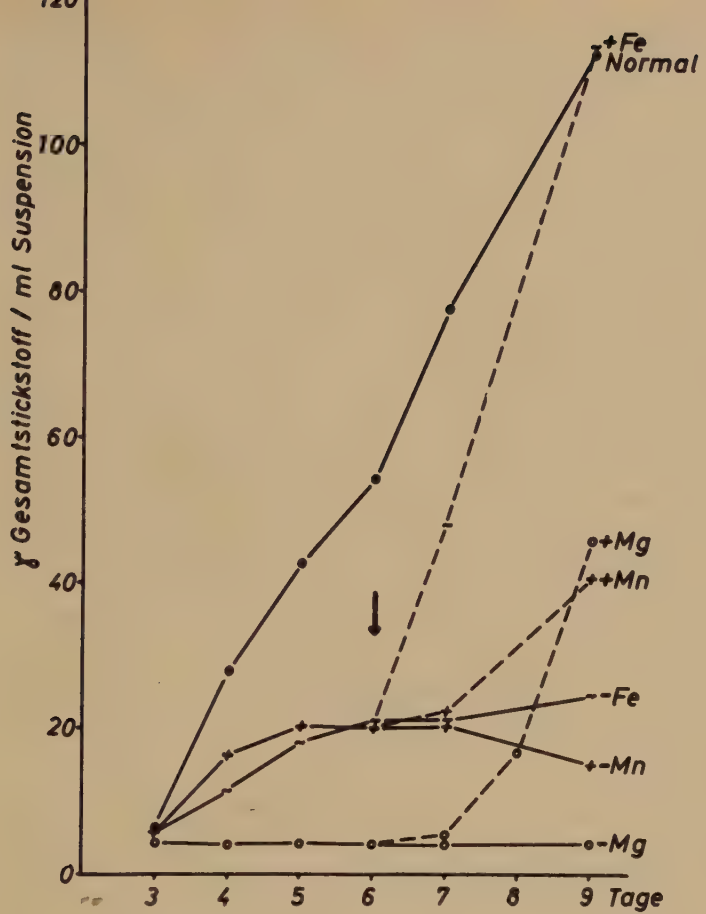

Abb. 12: Verhalten des Gesamtstickstoffs der Algen bei Normalkultur und bei Mg-, Mn- und Fe-Mangelkulturen im Dauerlicht.
Für diese und die beiden folgenden Abbildungen gilt: Der Pfeil bezeichnet die Zugabe des fehlenden Elementes in Normaldosis zu einer entsprechenden Parallelkultur.
Die gestrichelten Kurven geben das Verhalten in den jeweiligen Erholungsphasen wieder.

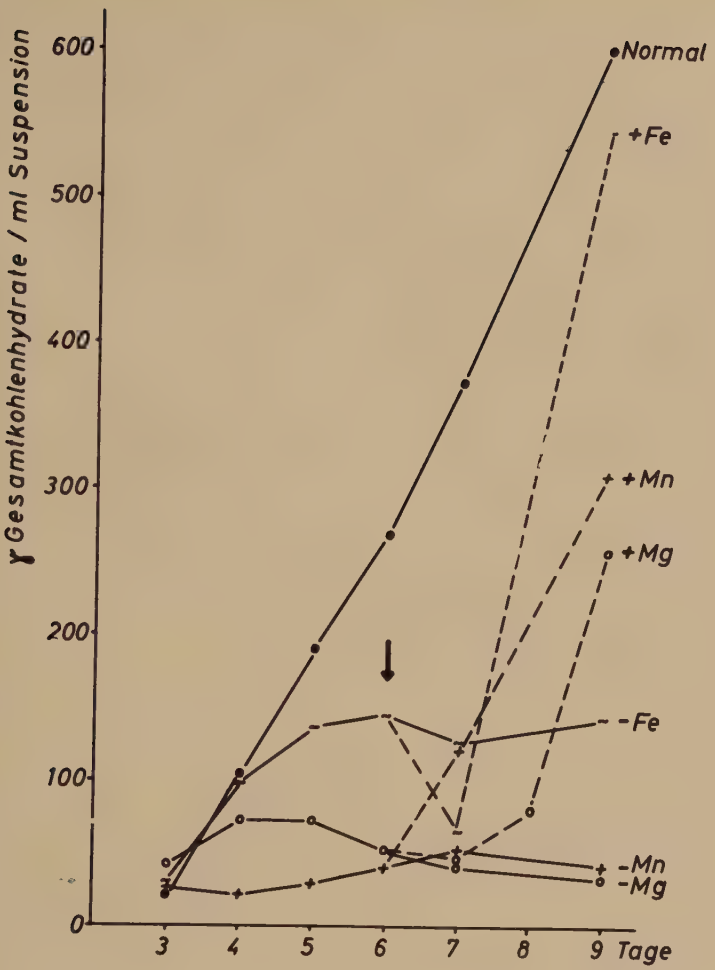

Abb. 13: Verhalten der Gesamt-Kohlenhydrate der Algen bei Normalkultur und bei Mg-, Mn- und Fe-Mangelkulturen im Dauerlicht

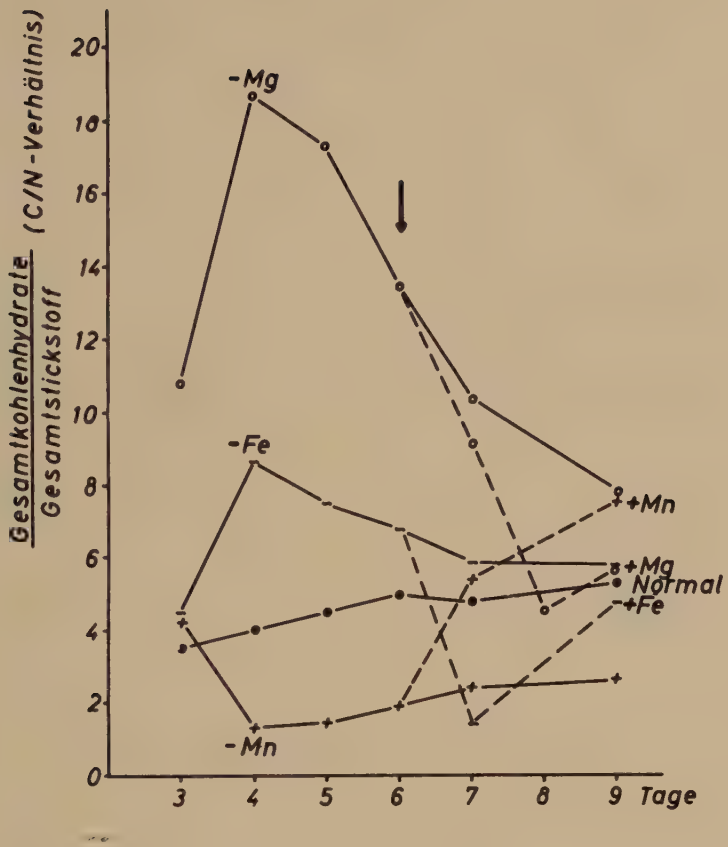

Abb. 14: Verhalten der Gesamt-Kohlenhydrate bezogen auf Gesamtstickstoff (C/N-Verhältnis) bei Normalkultur und bei Mg-, Mn- und Fe-Mangelkulturen im Dauerlicht

C/N-Verhältnis ist anfangs noch ein Wachstum möglich, es findet also eine Ausnutzung der Kohlenhydrate statt, welche die Synthese (Nachlieferung) übersteigt. In späteren Mangelstadien ist der niedrige C/N-Wert nicht mehr mit Wachstum verbunden. Dieser Befund läßt auf eine Verzögerung der Synthese der Kohlenhydrate schließen, die besonders in späteren Stadien im Gewicht fällt. Der Proteingehalt der Mangelzellen gleicht während der ganzen Versuchszeit demjenigen der normalen Algen.

Mn-Mangel führt bei Chlorella, wie schon früher festgestellt worden ist (PIRSON, ALBERTS-DIETERT), nicht zu einer eigentlichen Chlorose. Auch in den hier vorliegenden Versuchen wurde - und zwar bei Eintritt des Wachstumsstillstandes - nur eine relativ geringe Abnahme des Chlorophyllgehalts der Zellen beobachtet. Jedoch scheinen die ungünstigen Bedingungen späterer Mn-Mangelstadien auch den Chlorophyllgehalt zu senken.

Wenn den Mangelkulturen $MnCl_2$ zugefügt wurde, wurde am nächsten Tage eine rasche Zunahme der Kohlenhydrate nachgewiesen. Der Anstieg des C/N-Wertes zu normaler Höhe ist der raschen Wiederherstellung der Kohlenhydratsynthese zuzuschreiben. Die Zunahme der Kohlenhydrate erfolgt in stärkerem Maße als ihre Ausnutzung und führt zu kontinuierlichem Anstieg des C/N-Verhältnisses bis über den Normalwert.

Die Abnahme des Chlorophyllgehalts der Zellen nach Zugabe von Mn scheint auf den Anstieg des Gesamt-N-Gehalts der Algensuspension zurückzuführen zu sein, der nicht mit Chlorophyllbildung einhergeht.

Die hier dargestellten Versuchsergebnisse über die selektive Wirkung des Mn auf die Kohlenhydratsynthese stimmen überein mit den Erfahrungen über die Rolle des Mangans bei der Photosynthese (vgl. PIRSON 1958).

3. Eisenmangel

Während des Eisenmangelstadiums schreitet die Weiterentwicklung zunächst noch langsam fort. Die Gesamt-Kohlenhydrate der Algensuspension nehmen anfangs normal zu; später bleiben sie mehr oder weniger konstant, wobei der Kohlenhydratgehalt relativ höher liegt als im Mn- oder Mg-Mangel, aber deutlich niedriger bleibt als in der Normalkultur.

Die Änderungen im C/N-Verhältnis zeigen eine anfängliche Anhäufung der Kohlenhydrate an. Darauf folgt eine stufenweise Abnahme, welche durch die starke Verzögerung der Kohlenhydratsynthese bewirkt wird. Der Proteingehalt der Zellen verbleibt im allgemeinen im normalen Bereich; nur in späteren Mangelstadien ist eine schwache Abnahme zu beobachten, obgleich der Gesamtstickstoff pro ml Algensuspension relativ zunimmt. Die Zunahme des letzteren erklärt sich aus der Anhäufung des gesamten löslichen N und nicht aus einer Proteinsynthese.

Chlorose zeigt sich von Anfang an, aber zunächst nicht in gleichem Ausmaß wie bei Mg-Mangel. Erst mit der Zeit nimmt der Chlorophyllgehalt der Zellen ab und führt schließlich, wie bei Versuchsende beobachtet wurde, zu der typischen starken Fe-Chlorose.

Unmittelbar auf die Zugabe von $FeSO_4$ zu den Mangelkulturen folgt eine Abnahme ihrer Kohlenhydrate und eine rasche Zunahme des Gesamt-N pro ml Algensuspension.

Der C/N-Wert ist nach Fe-Gabe zunächst stark erniedrigt, was besagt, daß die Verarbeitung der Kohlenhydrate die Neusynthese derselben weit übertrifft. Nach einem Tage sind Protein- und Chlorophyllsynthese wie auch das Wachstum völlig normal. Darauf folgt eine Erhöhung des C/N-Verhältnisses auf den Normalwert, was anzeigt, daß nun auch die Kohlenhydratsynthese in vollen Gang gekommen ist. In manometrischen "Erholungs"versuchen hat sich Eisen als zu der Gruppe der Elemente gehörig erwiesen, deren Abwesenheit eine Störung des Photosyntheseapparats hervorruft, die nur stufenweise in Verbindung mit Neubildung von Pigment bzw. Ausgleich des Protein-Defizits reparabel ist (vgl. PIRSON u. Mitarb. 1952).

Die Wirkung von Eisen auf die Chlorophyllbildung zeigt sich vor allem in der unmittelbaren Erhöhung des Chlorophyllgehalts der Zellen auf den Normalwert einen Tag nach Zugabe des Eisens.

Die Befunde über das Verhalten des Kohlenhydrat-, Protein- und Chlorophyllgehalts der untersuchten Mangelkulturen während des Mangelstadiums und bei Erholung sind in Tabelle (7) zusammengefaßt worden. In den K- und Mn-Mangelversuchen kam es bei der Erholung unmittelbar

Tabelle 7:

	C/N		Chlorophyll		Protein	
Mangel-Element	A	B	A	B	A	B
Mn	bedeutend erniedrigt	normalisiert	wenig erniedrigt keine eigentliche Chlorose	wenig erniedrigt	unverändert	unverändert
K	erhöht	normalisiert	erniedrigt	teilweise normalisiert	unverändert oder wenig erniedrigt	normalisiert
Mg	bedeutend erhöht	wenig erniedrigt (praktisch unverändert)	stark erniedrigt	teilweise normalisiert	bedeutend erniedrigt	teilweise normalisiert
Fe	wenig erhöht	bedeutend erniedrigt	bedeutend erniedrigt	normalisiert bzw. leicht erhöht	wenig erniedrigt oder unverändert	normalisiert

A = im Mangelzustand

B = bei Erholung (1 Tag nach Zugabe des fehlenden Elements)

zu einer vollständigen Normalisierung des C/N-Verhältnisses. Während der Einfluß des Mangans nur den Anstieg des C/N-Verhältnisses auf den Normalwert bewirkt, kommt es beim K zugleich zu Chlorophyll- und Proteinbildung. Im Falle von Mg und Fe wird das C/N-Verhältnis nicht sogleich wiederhergestellt, vielmehr reagieren zunächst Chlorophyll- und Proteinbildung auf die zugefügten Ionen.

Es ergab sich, daß die während des K-Mangelstadiums auftretenden Stoffwechselstörungen im wesentlichen nicht auf strukturelle Störungen der Zellen zurückzuführen sind wie bei Mg- und Fe-Mangel, sondern daß sie mehr "oberflächlicher" Natur und daher leichter reparabel sind. Durch Zugabe von K konnten die Anomalien unmittelbar korrigiert werden, was zur raschen Wiederherstellung eines normalen Stoffwechsels der Zellen führte (vgl. PIRSON u. Mitarb. 1952).

B. Über den Phosphathaushalt von Chlorella bei Mineralsalzmangel

I. Kaliummangel

Chlorella wurde in normaler und in K-Mangel-Nährlösung (mittlerer Kaliummangelgrad = 1/1000 der normalen Konzentration von Kalium) bei kontinuierlichem Licht auf die bereits in Kapitel A I beschriebene Weise kultiviert. Proben der Algensuspension wurden dem betreffenden Medium am 4., 8., 10. und 14. Tag nach der Überimpfung entnommen. Die Analyse ihrer Phosphatfraktionen erfolgte entsprechend den Angaben von PIRSON u. KUHL (1958), die, wie im methodischen Teil angegeben, auf Chlorella angewandt wurden. Die durch Analyse der Phosphatverbindungen der Zellen am 4. und 8. bzw. am 10. und 14. Tag gewonnenen analytischen Daten sollten das Verhalten der verschiedenen Phosphatfraktionen in frühen und späteren Stadien des Mangels zeigen. Bei diesem Vergleich mußte jeweils das Alter der Kultur berücksichtigt werden, da auch in Normalzellen Änderungen in den Phosphatfraktionen eng mit dem Alter der Anzuchten verbunden sind. Die Daten von K-Mangelzellen wurden daher verglichen mit solchen normaler Zellen gleicher Kulturdauer (Abb. 15).

1. Frühe Stadien (4.-8. Anzuchttag)

Normale Chlorellazellen zeigten am 4. Tage einen relativ höheren Anteil an TES-unlöslichen "7 min"-Phosphaten, weil sie sich noch in einer Anfangsphase relativer Wachstumshemmung befanden. Am 8. Tage zur Zeit der größten Wachstumsgeschwindigkeit, waren die TES-unlöslichen "7 min"-Phosphate stark reduziert, während die anderen Fraktionen nur geringfügige Änderungen aufwiesen.

Im gleichen Wachstumsstadium zeigten K-Mangelzellen eine relativ geringere Abnahme ihres Gesamtphosphats. Diese Abnahme entsprach praktisch dem Schwund kleiner Mengen der TES-unlöslichen "7 min"-Phosphate, sonst war keine andere merkliche Änderung festzustellen.

Dies Verhalten zeigt, daß die Veränderungen der Phosphatfraktionen in K-Mangelzellen in diesem Stadium relativ geringer sind als

in normalen Zellen, vor allem diejenigen, die auf dem teilweisen Schwund der "7 min"-Phosphate beruhen.

Tabelle 8:

Veränderungen der Phosphatfraktionen von Normal- und Kaliummangelzellen in Abhängigkeit von der Anzuchtdauer.

Die angegebenen Werte stellen den prozentualen Anteil am jeweiligen Gesamtphosphat dar und sind nach den Daten der Abb. (15) errechnet.

Normal

Tage nach Versuchsbeginn	4	8	10	14
A Ph	9,1	9,9	11,6	7,7
SL-Sto Ph	7,0	9,3	5,4	2,0
SL-7 Ph	6,3	10,8	17,2	25,5
SU-7 Ph	48,0	35,4	40,6	43,3
SU-Sto Ph	29,6	34,6	25,2	21,5

K-Mangel

A Ph	10,5	11,8	14,0	22,0
SL-Sto Ph	5,6	4,6	2,9	14,9
SL-7 Ph	10,2	10,0	8,4	12,3
SU-7 Ph	36,3	33,6	34,0	38,7
SU-Sto Ph	37,4	40,0	40,7	12,1

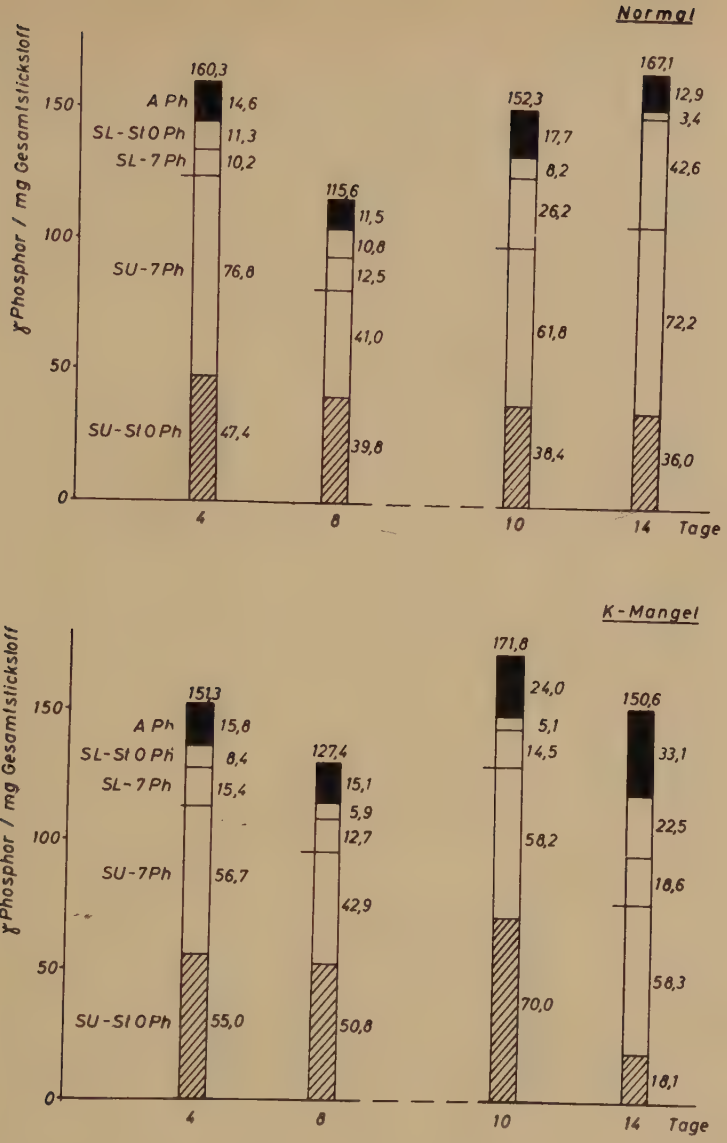

Abb. 15: Verhalten der P-Fraktionen von Chlorella bei Normalkultur und K-Mangelkulturen im Dauerlicht.
Normal = Anfangskonzentration $8 \cdot 10^{-3}$ mol KNO_3
K-Mangel = Anfangskonzentration $8 \cdot 10^{-6}$ mol KNO_3
Erklärung der verwendeten Abkürzungen siehe Abb. 7.

2. Spätere Stadien (10. - 14. Anzuchttag)

Im weiteren Anzuchtverlauf zeigten die normalen Zellen gegenüber dem Stand am 8. Tage eine fortschreitende Zunahme ihrer Gesamtphosphate. Diese Zunahme resultierte aus der Anhäufung von TES-löslichen und -unlöslichen "7 min"-Phosphaten, bei in ersteren in stärkerem Ausmaß. Hierzu berichten FRIEDMAN u. FOX (1954), daß in Zellen von Escherichia coli, die bei optimalen Kaliumkonzentrationen gewachsen waren, kleine Mengen von Nucleotidpyrophosphaten gefunden wurden, die aber relativ größer waren als die bei mittleren K-Konzentrationen. Auch die im Wachstum jetzt stark gehemmten K-Mangelkulturen wiesen eine Zunahme ihrer Gesamtphosphate auf. Diese Speicherung betrifft alle Fraktionen annähernd gleichmäßig. Die in Normalkulturen beobachtbare Bevorzugung der TES-löslichen "7 min"-Phosphate unterbleibt vollständig.

Das Endstadium der dichten Normalkulturen am 14. Kulturtage zeigt die schon vorher bestehende Tendenz zur relativen Anreicherung der "7 min"-Phosphate. Das Endstadium des Kalimangels dagegen läßt tiefgreifende Umwandlungen erkennen. Die TES-unlöslichen stabilen organischen Phosphate haben einen ausgesprochenen Zusammenbruch erlitten, während das anorganische Phosphat deutlich zugenommen hat. Gleichzeitig ist hier nun auch eine mäßige Vermehrung in allen anderen Fraktionen zu erkennen. Zweifellos handelt es sich hier um Sekundärvorgänge im schweren Mangel, die für eine Analyse der Kaliumwirkung nicht mehr geeignet sind.

Die vorausstehende Versuchsserie zeigt, daß allgemein im Laufe der Zeit in ein und derselben Kultur Änderungen im Gehalt der verschiedenen Phosphatfraktionen auftreten können. In der Normalkultur sind die Änderungen weitgehend auf die "7 min"-Phosphate beschränkt. Diese Fraktion enthält die labilen kondensierten anorganischen Orthophosphate (Polyphosphate) mit energiereichen Bindungen (vgl. WINTERMANS 1955). Dieser Normalverlauf wird offensichtlich durch K-Mangel verändert. In frühen Mangelstadien findet ein geringerer Schwund der Polyphosphate enthaltenden Fraktion statt, dem in späteren Stadien eine verzögerte Bildung von TES-löslichen und -unlöslichen "7 min"-Phosphaten folgt.

Es kann daher die Frage aufgeworfen werden, ob das Kalium spezifisch in die Phosphorylierungsvorgänge eingreift, wofür bereits seit länge-

rer Zeit Daten aus der Enzymologie (LARDY 1951) und neuerdings Beobachtungen an verarmten Zellen (Hefe und Chlorella) in kurzfristigen Experimenten (LATZKO und CLAUS 1958, LATZKO und MECHSNER 1958 und MECHSNER 1959) vorliegen.

Es erschien auch hier zweckmäßig, der Beschreibung der Kalimangelzustände das Verhalten im Erholungsexperiment zuzuordnen. Dabei war der Vergleich zwischen Licht und Dunkelbehandlung wichtig, um etwaige Unterschiede zwischen der oxydativen Phosphorylierung und der Lichtphosphorylierung herauszuarbeiten. Schließlich mußte besonders darauf geachtet werden, ob die Produkte der Phosphorylierungsvorgänge besonders (ATP) im weiteren Stoffwechsel Energieacceptoren fanden oder sich anhäufen und eventuell Polyphosphate bilden konnten. Als solche Acceptoren konnten das von außen gebotene CO_2 und das Nitrat dargeboten oder weggelassen werden.

II. Die Wirkung von Kalium auf Chlorella-Zellen bei K-Mangel im Licht und im Dunkeln

In den folgenden Versuchsreihen wurden Chlorella-Zellen in der K-Mangel-Nährlösung K_{II} (mittlerer Mangelgrad) kultiviert, welche anfangs $8 \cdot 10^{-6}$ mol KNO_3 (d.h. 1/1000 der normalen K-Konzentration) enthielt. Die fehlende Menge KNO_3 wurde in der K-Mangellösung durch die aequivalente Menge $NaNO_3$ ersetzt. Vom Datum der Beimpfung an wuchsen die Zellen während 8 Tagen unter den vorstehend genannten Bedingungen, d.h. in kontinuierlichem Licht (5000 Lux), bei 25°C und belüftet mit einem Luft/CO_2-Gemisch (1,5 vol. % CO_2). Am 8. Tage wurden die K-Mangelzellen aus 6 Kulturröhren geerntet und gemischt, um eine homogene Suspension zu erhalten. Nach Entfernung der alten Nährlösung durch Zentrifugieren wurden die Chlorellazellen in doppelt destilliertem Wasser gewaschen, und eine Probe der Algensuspension wurde für die erste Analyse entnommen. Zwei gleiche Mengen von Chlorellazellen wurden dann in je 2 neue Nährlösungen eingebracht. Eine derselben wurde mit Kalium in der für den Versuch erforderlichen Verbindung (entweder KNO_3 oder KCl) versehen, und zwar in der normalen Dosis (+K). Der anderen fehlte Kalium (-K), das aber je nach den Versuchsbedingungen durch aequivalente Mengen eines Na-Salzes ($NaNO_3$ oder NaCl) ersetzt war. Der anfängliche p_H-Wert der Nährlösungen lag stets bei 6,3 - 6,4;

wenn er sich änderte, ist es im folgenden besonders vermerkt.

Jede der so angesetzten Algensuspensionen (d.h. mit und ohne Kalium) wurde volumetrisch in zwei Gruppen geteilt, von denen die eine im Licht verblieb, während die andere im Dunkeln gehalten wurde, so daß folgende Gruppierung resultierte:

Im Licht: mit Kalium versetzte Suspension (+K)
im Kaliummangel verbliebene Suspension (-K)

Im Dunkeln: mit Kalium versetzte Suspension (+K)
im Kaliummangel verbliebene Suspension (-K)

6 und 48 Stunden nach Versuchsbeginn wurden Proben der verschieden behandelten Algensuspensionen zum Zwecke der Analyse des anorganischen Orthophosphats (im TES-Extrakt), der gesamten "7 min"-Phosphate[1] (TES-lösliche und unlösliche) und der gesamten stabilen organischen Phosphate[2] der Algen (einschließlich der TES-löslichen und unlöslichen Fraktionen) entnommen. Die Werte sind in γ Phosphor pro mg Gesamtstickstoff der Algen wiedergegeben. In der oben beschriebenen Versuchskombination wurde der Einfluß des Kaliums auf K-Mangel-Chlorellazellen im

---

1) Ein gewisses Volumen der Algensuspension wurde, unmittelbar nachdem es in doppelt destilliertem Wasser gewaschen worden war, während 7 Min. durch 1 n HCl bei 100°C hydrolysiert und nach dem Abkühlen zentrifugiert, worauf von dem klar Überstehenden 1 ml zur Phosphatbestimmung nach Methode I entnommen wurde. Das gleiche Volumen der Algensuspension diente zur Extraktion mit kalter 5 %iger TES; hierdurch erhaltenes anorganisches Orthophosphat wurde sodann in 1 ml des Extraktes nach Methode II (s. methodischer Teil) bestimmt. Die Differenz zwischen den Werten der beiden Fraktionen ergab den tatsächlichen Wert der gesamten "7 min"-Phosphate.

2) Der Wert für die gesamten stabilen organischen Phosphate wurde errechnet aus der Differenz zwischen dem Wert für das Gesamtphosphat der Algen einerseits und den Werten für die anorganischen Orthophosphate und die "7 min"-Phosphate andererseits.

Licht und im Dunkeln unter Berücksichtigung der Gegenwart oder des Fehlens von Kohlendioxyd und Nitrat untersucht, wobei jeder Faktor einzeln oder beide gemeinsam betrachtet wurden. Die Wirkung des Kaliums wurde auch bei verschiedenen p_H-Werten untersucht (s. weiter unten).

1. In Gegenwart von CO_2 und Nitrat[1)]

Wie Abb. 16 zeigt, hat der Gesamtphosphatgehalt der (+K)-Zellen nach 6 Stunden um etwa 17 % demjenigen der (-K)-Zellen im Licht zugenommen; zu dieser Zeit war noch kein Wachstum erfolgt, die Bezugsgröße somit unverändert. Die Phosphatzunahme beruht im wesentlichen auf dem Anstieg des anorganischen Orthophosphats. Letzteres hat zwar zur gleichen Zeit auch in den (-K)-Zellen im Licht zugenommen, größtenteils aber infolge des partiellen Abbaus der stabilen organischen Phosphate.

Im Dunkeln zeigten (+K)-Zellen nach 6 Stunden kaum einen Unterschied in den Phosphatmengen ihrer Fraktionen, wenn man sie mit denen der (-K)-Zellen verglich. Beide Kulturen hatten anorganisches Orthophosphat angereichert und ihren Gehalt an stabilen organischen Phosphaten entsprechend vermindert, während die "7 min"-Phosphate in (+K)-Zellen im wesentlichen unverändert und in (-K)-Zellen geringfügig vermindert waren.

Der Gesamtphosphatgehalt von (+K)-Zellen zeigte nach 48 Stunden im Licht eine starke Abnahme gegenüber dem Gehalt nach 6 Stunden. Davon waren die Phosphatfraktionen im gleichen Ausmaß betroffen. Es ist daher anzunehmen, daß diese Abnahme einer Änderung der Bezugsgröße dem Gesamtstickstoff zuzuschreiben ist. Denn Letzterer war nach 48 Stunden stark angestiegen (vgl. Abb. 11). Diese Tatsache kompliziert die Auswertung insofern, als ein direkter Vergleich mit den Parallelen im

1) Bei diesem Versuch wurde für die (+K)-Nährlösung das Nitrat als KNO_3 in der normalen Dosis verwandt, für die (-K)-Nährlösung als $NaNO_3$ in aequivalenter Menge. Die unterschiedlichen Medien hatten einen Anfangs-p_H-Wert von 6.35, welcher im (+K)-Medium im Licht nach 48 Stunden auf 7,4 anstieg; die anderen Medien zeigten zur gleichen Zeit entweder einen geringen Anstieg oder sie blieben unverändert.

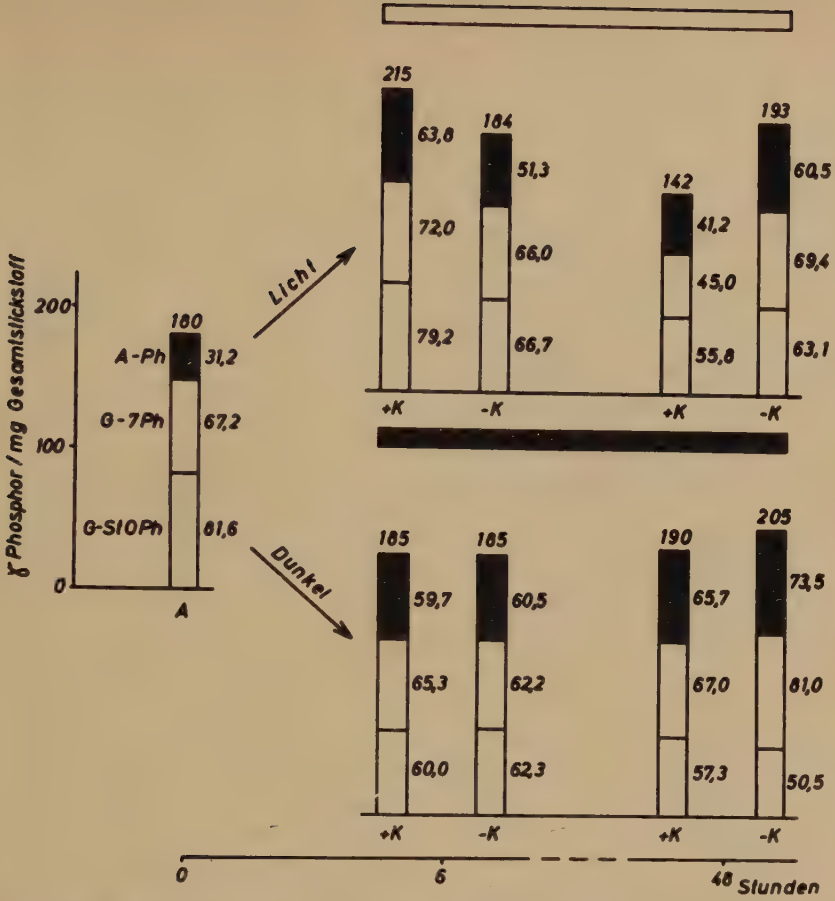

Abb. 16: Die Wirkung von Kalium auf verschiedene P-Fraktionen von K-Mangelzellen im Licht und im Dunkeln in Anwesenheit von CO_2 und Nitrat.
+K = Nährlösung erhielt $8 \cdot 10^{-3}$ mol KNO_3
- K = Nährlösung behielt als Ersatz für KNO_3 $8 \cdot 10^{-3}$ mol $NaNO_3$
Für diese und die Abbildungen 17, 18, 19 und 21 gilt: Das Ausgangsmaterial (A) war 8 Tage lang im Dauerlicht in mittlerer K-Mangellösung ($K_{II} = 8 \cdot 10^{-6}$ mol KNO_3) mit normaler CO_2-Begasung angezogen worden.
Für alle Darstellungen in der gleichen Art gilt: APh = anorganisches Orthophosphat, G-7 Ph = gesamtes "7 min"-Phosphat, G-StoPh = gesamtes stabiles organisches Phosphat

Licht und Dunkeln unmöglich war, weil diese in ihrem Gesamtstickstoff unverändert geblieben waren.

2. Bei Fehlen von CO_2[1] und in Gegenwart von Nitrat[2]

Wurde die Photosynthese durch Entzug von CO_2 im Licht unterbunden (s. Abb. 17), so stieg der Gehalt der so behandelten Zellen an gesamten "7 min"-Phosphaten im Licht an, wenn man ihn nach 6 Stunden mit dem Gehalt in Gegenwart von CO_2 (s. Abb. 16) verglich, und zwar hatten (+K)-Zellen relativ mehr "7 min"-Phosphate als (-K)-Zellen. In (+K)-Zellen war die Abnahme an stabilen organischen Phosphaten geringer als in (-K)-Zellen, obgleich beide etwa denselben Gehalt an anorganischem Orthophosphat hatten, was besagt, daß eine solche Zunahme in (+K)-Zellen z.T. der Wirkung des Kaliums (Phosphataufnahme) zuzuschreiben ist. Nach 48 Stunden haben sich die dargestellten Fraktionen der (+K)-Zellen, verglichen mit dem Zustand nach 6 Stunden im Licht unterschiedlich verändert, was die Möglichkeit ausschließt, daß diese Veränderung nur auf eine Verschiebung der Bezugsgröße zurückzuführen sei[3]. Vielmehr lassen sie sich damit erklären, daß die Menge des anorganischen Phosphats zugenommen hat (35 %), und zwar teilweise auf Kosten der gesamten "7 min"-Phosphate (Abnahme 45 %) und der gesamten organischen Phosphate (Abnahme 27 %), während die Abnahme des Gesamtphosphats nur 15 % beträgt. Die Verminderung des gesamten "7 min"-Phosphats ist mit einer vom Kaliumzusatz aktivierten Ausnutzung derselben erklärbar. Dabei dürfte die Nitratassimilation maßgeblich sein; denn diese ist auch im Licht in Abwesenheit von CO_2 mit Hilfe von Kohlenhydratreserven

1) Um das CO_2 zu entfernen, wurde es durch starke KOH hindurchgeleitet.

2) Nitrat wurde hier ebenso verwandt wie im vorhergehenden Versuch. Die Nährlösung (+K) im Licht zeigte nach 48 Stunden einen Anstieg des Anfangs-p_H-Wertes von 6,3 auf 6,8; in den anderen Medien dagegen waren zur gleichen Zeit keine Veränderungen oder nur ein geringer Anstieg zu beobachten.

3) In diesem Versuch im Licht nahm für die gleiche Versuchsdauer (48 Stunden) der Gesamtstickstoff der Algen bei CO_2-Entzug um 50 % weniger zu als bei Anwesenheit von CO_2.

in beschränktem Maße möglich. (-K)-Zellen reicherten zur gleichen Zeit anorganisches Orthophosphat an, im wesentlichen ohne Veränderung ihrer gesamten "7 min"-Phosphate und ihrer stabilen organischen Phosphate. Eine solche Phosphataufnahme in (-K)-Zellen kann also bis zu gewissem Grade auch im Kalimangel stattfinden.

Nach 6-stündigem Aufenthalt im Dunkeln häuften alle Zellen anorganisches Orthophosphat an unter gleichzeitiger Abnahme ihrer gesamten stabilen organischen Phosphate. (+K)-Zellen unterschieden sich von (-K)-Zellen durch einen relativ leicht erhöhten Gehalt an "7 min"-Phosphaten und anorganischem Orthophosphat. Nach längerer Zeit (48 Stunden im Dunkeln) nahm das anorganische Orthophosphat in den (-K)-Zellen relativ stärker zu als in den (+K)-Zellen, nämlich um 62 bzw. 31 % des Gehalts nach 6 Stunden, ohne praktisch bedeutende Veränderungen ihrer gesamten stabilen organischen und ihrer "7 min"-Phosphate. Auch dies zeigt, daß der Kalimangel den Vorgang der Phosphataufnahme selbst nicht entscheidend beeinflußt. Die Wirkung des K auf die gesamten "7 min"-Phosphate im Dunkeln im Vergleich zu (-K)-Zellen war geringer als die entsprechende Wirkung im Licht (Verbrauch der gesamten "7 min"-Phosphate).

3. In Gegenwart von CO_2 und bei Fehlen von Nitrat[1)]

Sowohl (+K)- wie (-K)-Zellen zeigten (Abb. 18) nach 6 Stunden im Licht eine Zunahme des Gesamtphosphats, die bei (+K)-Zellen um 12 % höher lag als bei (-K)-Zellen. Diese Zunahme führte in beiden Kulturen zu einer Anhäufung teils von anorganischem Orthophosphat, teils von gesamten "7 min"-Phosphaten. Die Anhäufung war von einer Abnahme der gesamten stabilen organischen Phosphate begleitet, und zwar mehr in (-K)- als in (+K)-Zellen. Die Anhäufung des anorganischen Ortho- und der gesamten "7 min"-Phosphate in (+K)-Zellen waren in hohem Maße der Phosphataufnahme zuzuschreiben.

1) Die normale Dosis von KNO_3 wurde bei diesem Versuch in den (+K)-Nährlösungen durch aequivalente Mengen von KCl, in den (-K)-Medien durch aequivalente Mengen von NaCl ersetzt. Die betreffenden unterschiedlichen Medien hatten einen Anfangs-p_H-Wert von 6,3, der während der Versuchszeit praktisch unverändert blieb.

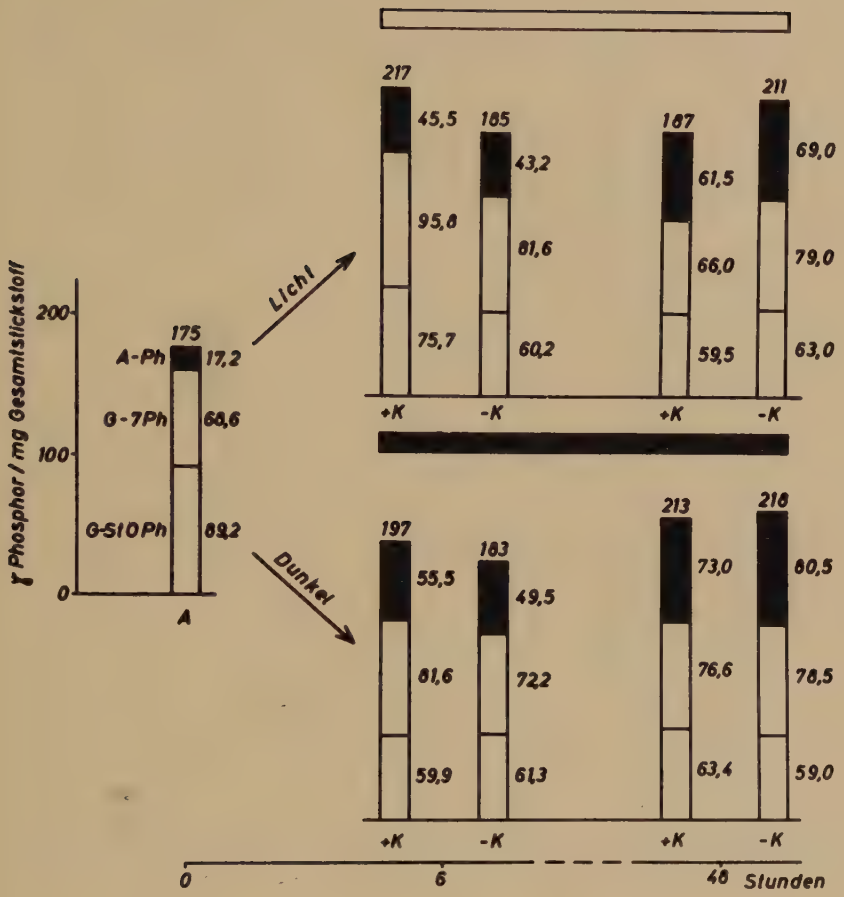

Abb. 17: Die Wirkung von Kalium auf verschiedene P-Fraktionen von K-Mangelzellen im Licht und im Dunkeln in Abwesenheit von CO_2 und Gegenwart von Nitrat.

+K = Nährlösung erhielt $8 \cdot 10^{-3}$ mol KNO_3

-K = Nährlösung behielt als Ersatz für KNO_3 $8 \cdot 10^{-3}$ mol $NaNO_3$

CO_2 war quantitativ durch Bindung an KOH aus der Luft entfernt worden.

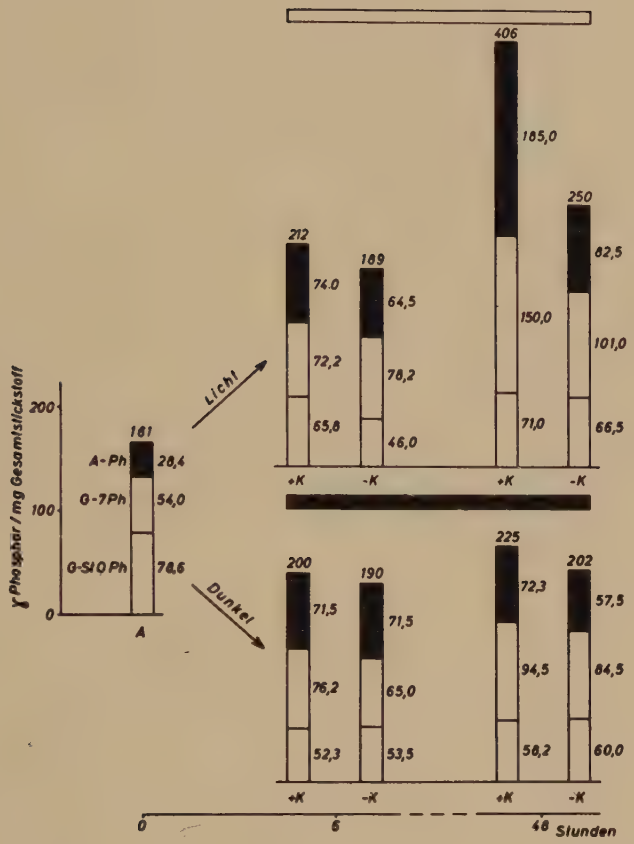

Abb. 18: Die Wirkung von Kalium auf verschiedene P-Fraktionen von K-Mangelzellen im Licht und im Dunkeln in Anwesenheit von CO_2 und Abwesenheit von Nitrat.
+K = Nährlösung erhielt $8 \cdot 10^{-3}$ mol KCl
-K = Nährlösung erhielt als Ersatz für KCl $8 \cdot 10^{-3}$ mol NaCl

Mit der Zeit (nach 48 Stunden) zeigten (+K)- und (-K)-Zellen eine Zunahme ihres Gesamtphosphats gegenüber demjenigen nach 6 Stunden, wobei Werte von 92 bzw. 32 % erreicht wurden. In diesen Zahlen offenbart sich die fördernde Wirkung des Kaliums auf die Phosphataufnahme. Diese Zunahme führte im allgemeinen zur Anhäufung der betreffenden Phosphatfraktionen, aber in verschiedenem Ausmaß. So war die Zunahme der gesamten stabilen organischen Phosphate in (-K)-Zellen relativ stärker als in (+K)-Zellen (45 bzw. 8 % ihres Gehalts nach 6 Stunden), woraus hervorgeht, daß die Anhäufung dieser Fraktion durch den K-Mangel nicht beeinflußt worden war. Die Anhäufung der gesamten "7 min"-Phosphate wuchs in (+K)-Zellen auf 200 % und in (-K)-Zellen nur auf 130 % an.

Dieser bemerkenswerte Anstieg des Gehalts an anorganischem Orthophosphat war aber von einer Anhäufung von Kohlenhydraten begleitet. Zu dieser kam es nur dann, und zwar nach relativ langer Zeit (48 Stunden), wenn den K-Mangelzellen im Licht in Gegenwart von CO_2 (Photosynthese) und bei Fehlen von Nitrat (keine Nitratassimilation) Kalium zugegeben wurde. Die positive C-Bilanz unter diesen Umständen gibt Tabelle (9) wieder.

Tabelle 9:

Absolute Veränderungen (+ = Zunahme, - = Abnahme) des C/N-Verhältnisses von K-Mangelzellen (-K) und K-Mangelzellen, denen K zugegeben wurde (+K) im Licht nach 48-stündiger Versuchszeit, in Gegenwart (+) und bei Fehlen (-) von entweder CO_2 oder Nitrat oder beiden zugleich.

	(-K)-Zellen	(+K)-Zellen
(+) CO_2, (+) Nitrat	-6,7	-11,1
(-) CO_2, (+) Nitrat	-5,2	- 8,1
(+) CO_2, (-) Nitrat	-0,5	+ 6,5
(-) CO_2, (-) Nitrat	-4,4	- 4,4

Daher dürfte diese Anhäufung des anorganischen Phosphats nicht direkt vom Kalium, sondern von den Produkten der Photosynthese (vor allem Kohlenhydraten) abhängig sein.

Im Dunkeln ging in (+K)- wie in (-K)-Zellen die Anhäufung des anorganischen Orthophosphats und "7 min"-Phosphats nach 6 Stunden mit einer Abnahme der gesamten stabilen organischen Phosphate und der Phosphataufnahme (angezeigt durch den Anstieg des Gesamtphosphats) einher. Die Wirkung des Kaliums äußerte sich in der verstärkten Anhäufung von "7 min"-Phosphaten in (+K)-Zellen, die in letzteren auf 140 % anstiegen und in (-K)-Zellen auf 120 % des Anfangsgehalts. Nach 48 Stunden jedoch zeigten beide Kulturen eine Anhäufung ihrer "7 min"-Phosphate entsprechend der Zunahme um 25 % in (+K)-Zellen und 30 % in (-K)-Zellen. Aus letzterem Verhalten wird deutlich, daß die Bildung von "7 min"-Phosphaten im Dunkeln durch K-Mangel tatsächlich nicht gehemmt wurde.

4. Bei Fehlen von CO_2 und Nitrat[1)]

In diesem Versuch (Abb. 19) wurde das Verhalten der genannten Phosphatfraktionen unter dem Einfluß von K-Mangel und bei Zugabe von K unabhängig von der CO_2- und Nitrat-Assimilation beobachtet. Sowohl (+K)- als auch (-K)-Zellen zeigten nach 6 Stunden im Licht wie auch im Dunkeln eine Zunahme ihres anorganischen Orthophosphats und ihrer gesamten "7 min"-Phosphate, verbunden mit einer Abnahme ihrer gesamten stabilen organischen Phosphate. Die Anhäufung des anorganischen Orthophosphats und der "7 min"-Phosphate ging mit einer relativen Zunahme ihres Gesamtphosphats einher (Phosphataufnahme), die in (+K)-Zellen wenig höher (11 % im Licht und 7 % im Dunkeln) war als in (-K)-Zellen. Von (+K)-Zellen wurden relativ größere Mengen (etwa 20 %) von anorganischem Orthophosphat angehäuft als von (-K)-Zellen, sowohl im Dunkeln als auch im Licht (d.h. der Vorgang war lichtunabhängig). Beim Vergleich von (+K)-Zellen mit (-K)-Zellen zeigte sich, daß bei ersteren die Anhäufung der gesamten "7 min"-Phosphate im Licht (15 %) relativ stärker war als im Dunkeln (7 %). Die Abnahme der gesamten stabilen organischen Phosphate war in (+K)- und (-K)-Zellen praktisch gleich.

---

1) Luft wurde durch starke Kalilauge hindurchgeleitet, um sie CO_2-frei zu machen. Die Entfernung von Nitrat aus den betreffenden Nährlösungen geschah auf die bei Versuch 3 beschriebene Weise. Der Anfangs-p_H-Wert der verschiedenen verwendeten Medien betrug 6,3 und veränderte sich während der Versuchszeit nicht.

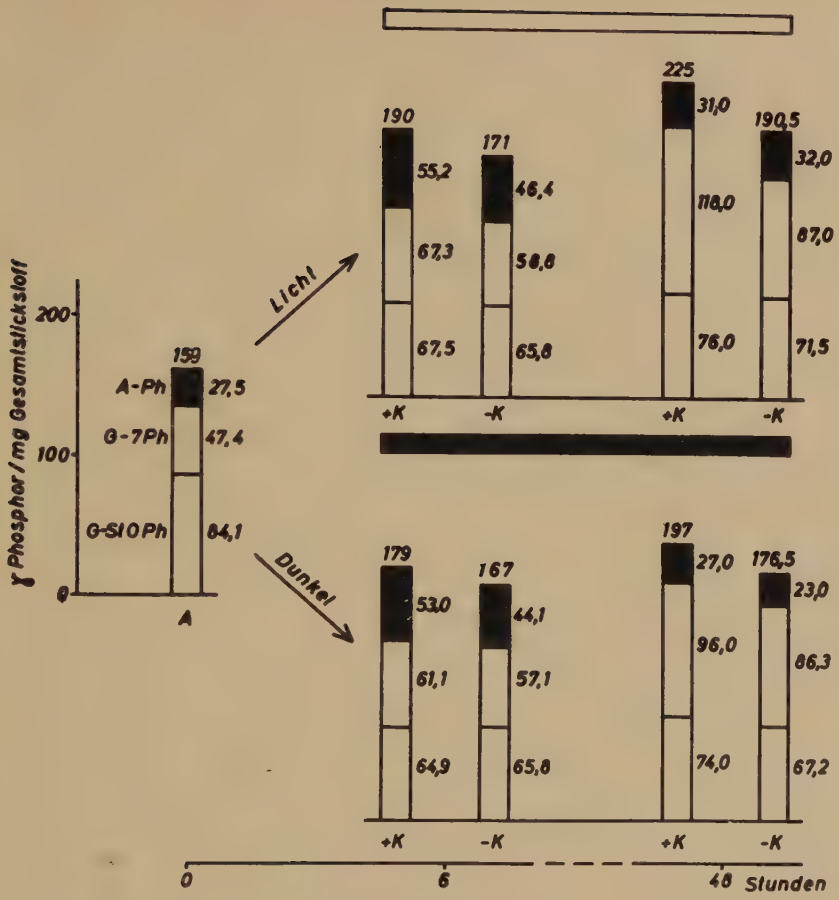

Abb. 19: Die Wirkung von Kalium auf verschiedene P-Fraktionen von K-Mangelzellen im Licht und im Dunkeln in Abwesenheit von CO_2 und Nitrat.
+K = Nährlösung erhielt $8 \cdot 10^{-3}$ mol KCl
-K = Nährlösung erhielt als Ersatz für KCl $8 \cdot 10^{-3}$ mol NaCl
CO_2 war quantitativ durch Bindung an KOH aus der Luft entfernt worden.

Somit hat die Zugabe von Kalium zu den K-Mangelzellen nach 6 Stunden die Vermehrung von anorganischem Orthophosphat im Licht und im Dunkeln auf etwa die gleiche Weise hervorgerufen. Andererseits war die Wirkung von K auf die Bildung von "7 min"-Phosphaten im Licht etwas stärker als im Dunkeln. Die Menge der gesamten "7 min"-Phosphate in (-K)-Zellen war nach 6 Stunden Licht gegenüber den Dunkelparallelen kaum vermehrt, d.h. es hatte keine Lichtphosphorylierung stattgefunden. Nach 48 Stunden war die Wirkung des K auf die Vermehrung der gesamten "7 min"-Phosphate im Licht wesentlich stärker als im Dunkeln während der gleichen Zeit. Der Zuwachs betrug im ersten Falle 76 %, im letzteren 57 % des Gehalts nach 6 Stunden. Bei der Anhäufung der gesamten "7 min"-Phosphate in (+K)- und in (-K)-Zellen im Dunkeln war nur eine relativ geringe Wirkung des Kaliums zu bemerken ((+K)-Zellen zeigten nach 48 Stunden eine Zunahme von 57 %, (-K)-Zellen eine solche von 51 % ihres Gehalts nach 6 Stunden). Während die Zugabe von Kalium die Anhäufung der gesamten "7 min"-Phosphate im Dunkeln nur schwach förderte, hat sie im Licht eine starke Wirkung ausgeübt.

Die Zunahme der "7 min"-Phosphate in (+K)-Zellen nach 48 Stunden Belichtung erfolgte z.T. mit Hilfe des zuvor angehäuften anorganischen Orthophosphats und z.T. durch neue Phosphataufnahme (angezeigt durch die Zunahme des Gesamtphosphatgehalts in (+K)-Zellen nach 48 Stunden). So könnte das relativ reichlichere Vorkommen von "7 min"-Phosphaten in (+K)-Zellen im Licht als Folge einer Wirkung des Kaliums auf die Phosphataufnahme angesehen werden, zumal (-K)-Zellen eine relativ geringere Anhäufung ihrer "7 min"-Phosphate, parallel zur geringeren Zunahme ihres Gesamtphosphats aufwiesen.

Diese Erklärung scheint nicht in erster Linie in Betracht zu kommen. Das ergibt sich, wenn man die Wirkung von Kalium auf die Anhäufung von anorganischem Orthophosphat in Gegenwart (Abb. 18) und bei Fehlen von CO_2 (Abb. 19) nach 48 Stunden im Licht vergleicht. Im ersteren Falle nehmen das anorganische Orthophosphat und die gesamten "7 min"-Phosphate nur 150 bzw. 108 % des Gehalts nach 6 Stunden zu, während im letzteren zur gleichen Zeit eine Abnahme des anorganischen Orthophosphats (44 %) und eine Zunahme von 76 % ihrer gesamten "7 min"-Phosphate zu beobachten war. Dies Verhalten zeigt, daß die Anhäufung der "7 min"-Phosphate im Licht in beiden Fällen stärker K-abhängig war als die des anorganischen Orthophosphats und nicht als einfache Folge

einer erhöhten Phosphataufnahme betrachtet werden kann. Über eine verstärkte Phosphatanhäufung in Gegenwart von CO_2 berichten HELDER (1952), SIMONIS u. GRUBE (1952), GRUBE (1953) und KUHL (1957). Dies Verhalten scheint in unserem Falle von einem relativ höheren Kohlenhydratgehalt der Zellen (Abb. 20) abhängig zu sein, es war aber auch Kalium erforderlich.

Bei Wiederholung dieses Versuchs[1] mit p_H-Werten von 4, 6 und 8 (bei gehemmter CO_2- und Nitratassimilation) wurden in (-K)-Zellen im Licht die gleichen Mengen von "7 min"-Phosphaten festgestellt wie im Dunkeln. Die Wirkung des zugegebenen Kaliums ((+K)-Zellen) auf die Bildung von "7 min"-Phosphaten im Licht war bei p_H 4 (11 %) geringer als bei p_H 6 und 8 (40 bzw. 60 %).

Andererseits erfolgte die Bildung von "7 min"-Phosphaten im Dunkeln in (-K)-Zellen bei p_H 4 in stärkerem Maße als bei p_H 6 und 8. (s. Abb. 21)

Aus diesen Versuchen geht die unterschiedliche Wirkung des K-Mangels auf die folgenden Prozesse des Phosphat-Stoffwechsels hervor: Die Phosphataufnahme sowohl im Licht als auch im Dunkeln, ferner die Bildung von "7 min"-Phosphaten im Dunkeln werden nur wenig verzögert. Dagegen wird die zusätzliche Bildung von "7 min"-Phosphaten im Licht völlig gehemmt.

Die Wirkung des zugegebenen Kaliums auf die drei besprochenen Vorgänge läßt sich wie folgt kennzeichnen:

1. Im Licht wird das anorganische Orthophosphat unter Kaliumeinfluß bei Gegenwart von CO_2 und Abwesenheit von Nitrat besonders deutlich angereichert. Diese Anhäufung geht mit einer Erhöhung des Kohlenhydratspiegels konform (vgl. Versuch 3).

---

1) Die betreffenden Nährlösungen erhielten durch verdünnte NaOH und HCl den gewünschten p_H-Wert. Proben wurden nur nach 48 Stunden entnommen, weil die Anhäufung der betreffenden Phosphatfraktionen (vor allem die der "7 min"-Phosphate) sich in unserem Falle bei längerer Versuchszeit deutlicher beobachten ließ. Der Anfangs-p_H-Wert blieb während der Versuchszeit unverändert.

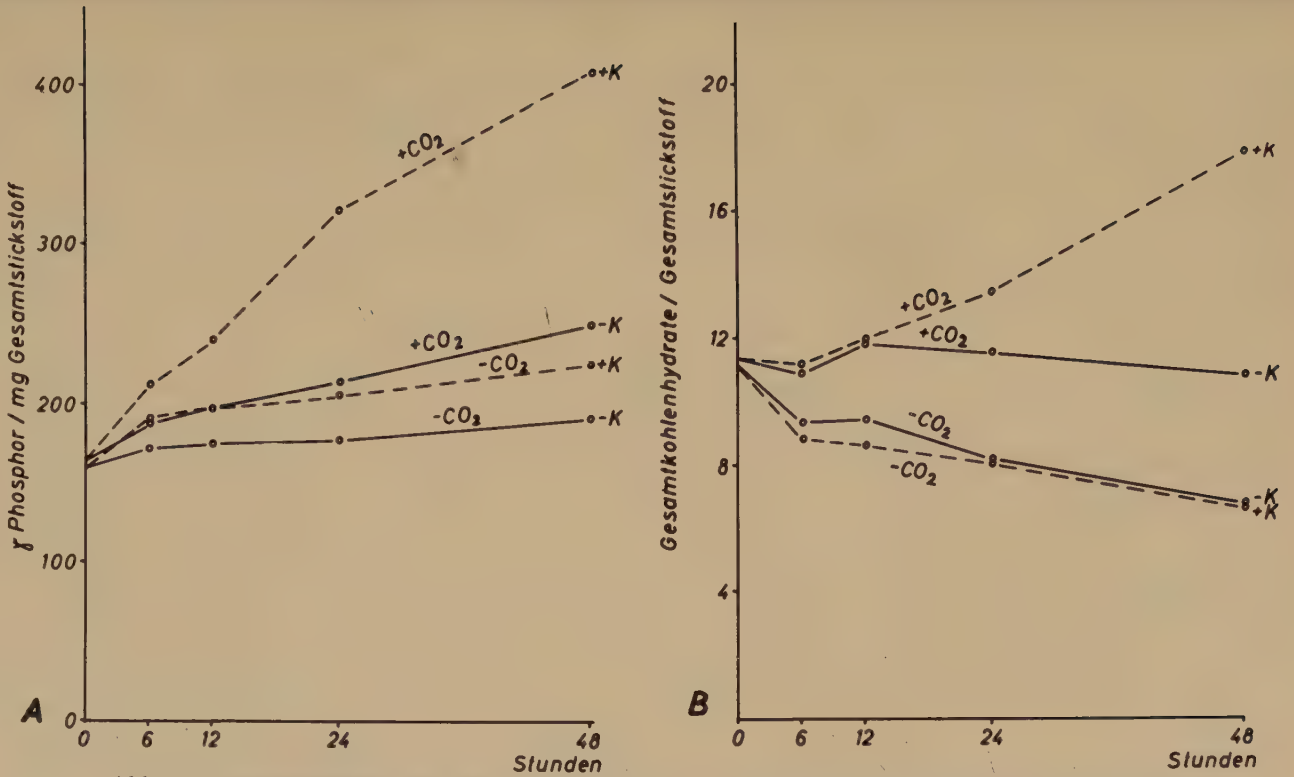

Abb. 20: Veränderungen des Gesamtphosphats (Abb. A) und der Gesamtkohlenhydrate (Abb. B) von K-Mangelzellen bezogen auf Gesamtstickstoff im Licht nach Zugabe von Kalium in Anwesenheit und Abwesenheit von CO_2 in nitratfreier Nährlösung.

+K = Nährlösung erhielt $8 \cdot 10^{-3}$ mol KCl

-K = Nährlösung erhielt als Ersatz für KCl $8 \cdot 10^{-3}$ mol NaCl

Das Ausgangsmaterial war zuvor 8 Tage lang im Dauerlicht in mittlerer K-Mangellösung (Anfangskonzentration = $8 \cdot 10^{-6}$ mol KNO_3) mit normaler CO_2-Begasung angezogen worden.

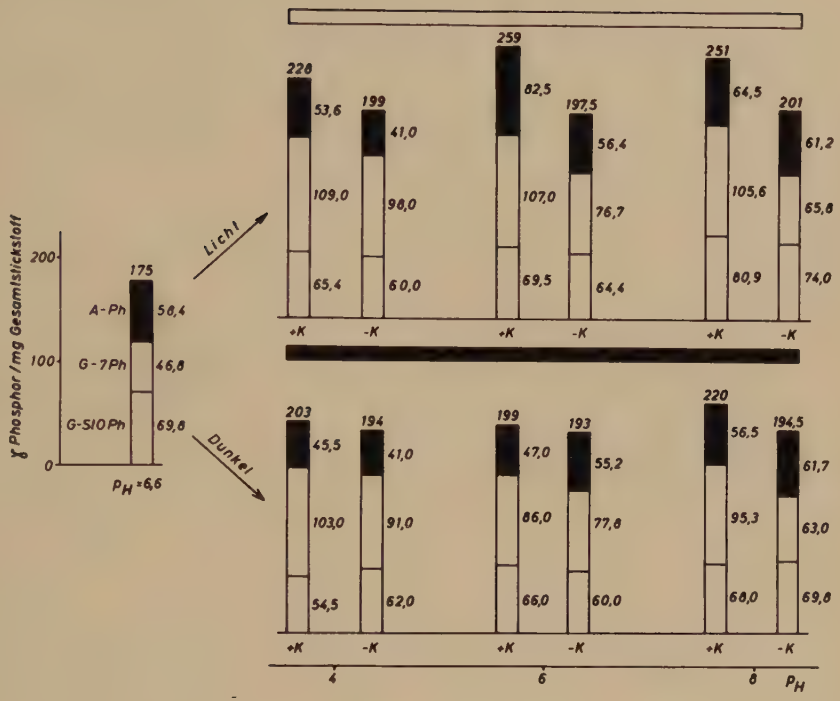

Abb. 21: Die Wirkung von Kalium auf verschiedene P-Fraktionen von K-Mangelzellen im Licht und im Dunkeln bei p_H 4, p_H 6 und p_H 8 in Abwesenheit von CO_2 und Nitrat.
+K = Nährlösung erhielt $8 \cdot 10^{-3}$ mol KCl
-K = Nährlösung erhielt als Ersatz für KCl $8 \cdot 10^{-3}$ mol NaCl
Die betreffenden Ausgangs-p_H-Werte der Nährlösungen wurden mit verdünnter Salzsäure bzw. Natronlauge eingestellt und blieben während der Versuchsdauer unverändert.

2. Im Dunkeln wird die auch im K-Mangel mögliche Bildung von "7 min"-Phosphaten durch K-Zugabe gefördert.

3. Die zusätzliche Bildung von "7 min"-Phosphaten im Licht tritt nur nach K-Zugabe ein, was bei Abwesenheit von Nitrat und CO_2 besonders deutlich hervortritt (Versuch 4).

III. Vergleichsversuche mit anderen Mangelzuständen

Zunächst seien in Tabelle 10 einige Daten zusammengestellt, welche die prozentuale Zusammensetzung von Mangelzellen wiedergeben, wie sie in frühen Mangelzuständen beobachtet wird, wo die ersten Mangelsymptome deutlich sichtbar werden. Naturgemäß sind diese Angaben nur in erster Näherung vergleichbar, da es kein Kriterium gibt, nach dem verschiedene Arten des Mineralsalzmangels auf eine exakte Vergleichsbasis gebracht werden können. Immerhin sind doch einige deutliche (und reproduzierbare) Merkmale zu verzeichnen.

Tabelle 10:

Prozentuale Anteile von 3 Phosphatfraktionen am Gesamtphosphat bei verschiedenen Mangelzuständen.

	K-Mangel	Mn-Mangel	Fe-Mangel	Mg-Mangel
anorganisches Orthophosphat	17	6,5	2,4	11,6
"7 min"-Phosphat	30	58,0	40,3	58,2
stabiles organisches Phosphat	53	35,5	57,3	30,2

Das anorganische Phosphat macht beim Kalimangel einen relativ großen Anteil aus, ihm entspricht der geringste Anteil an labilen Phosphaten. Dieser Tatbestand allein kann für sich als ein Indizium für die schon im

vorhergehenden Abschnitt belegte Bedeutung des Kaliums für die Phosphorylierungen (insbesondere die Lichtphosphorylierung) angeführt werden. Manganmangel, der sich schon bezüglich des Kohlenhydratspiegels als Gegenstück des Kaliummangels erwiesen hat, fällt durch einen hohen Gehalt an labilen Phosphaten auf, die sich auch färberisch als Polyphosphatgranula zu erkennen geben (durch Anwendung der Gallocyanin-Chromalaun-Färbungstechnik von STICH 1953). Diese Granula treten im Mn-Mangel deutlich stärker auf als in normal ernährten Zellen. Der Gehalt an anorganischem Phosphat ist vergleichsweise niedrig.

Eisenmangelzellen sind sehr arm an anorganischem Phosphat; dies spricht für eine besonders erschwerte Phosphoraufnahme, ist aber zugleich auch von methodischem Interesse, weil darauf geschlossen werden kann, daß die von uns jeweils bestimmte Fraktion des anorganischen Phosphats kein Artefakt des Aufschluß- und Fraktionierungsverfahrens darstellt, auf keinem Fall jedenfalls zwangsläufig aus einer der beiden anderen Fraktionen entsteht.

Der Mg-Mangel ist mit besonderer Vorsicht zu beurteilen. Der sehr hohe Gesamtgehalt der Mangelzellen an Phosphaten legt die Vermutung nahe, daß hier die Bezugsgröße (Gesamt-N) eine stärkere Verminderung erfahren hat, was ja auch die Daten des Abschnitts A III andeuten. Offensichtlich wirkt Mg-Mangel sehr rasch tiefgreifend auf den Stoffwechsel der Zellen ein (vgl. PIRSON u. Mitarb. 1952); die sofortige Stillegung der Zellteilung (LORENZEN 1957) durch Mg-Mangel läßt einen Einfluß über den Nuclein- und Proteinstoffwechsel recht naheliegend erscheinen. Der geringe Gehalt an stabilem organischem Phosphat deutet in dieselbe Richtung. Wenn der prozentuale Gehalt an labilen Phosphaten zugleich besonders hoch ist, so wird dies eher auf eine gehemmte Verwertung dieser Phosphate zurückzuführen sein als auf eine begünstigte Bildung derselben.

Im folgenden sind nun die Folgen einer Zuführung des jeweiligen Mangelions auf die Zusammensetzung der Phosphate dargestellt, wobei zur Abschwächung der Verwertung CO_2 und NO_3 ausgeschaltet waren; die Versuche sind somit mit der Kalimangel-Serie der Abb. (19) zu vergleichen.

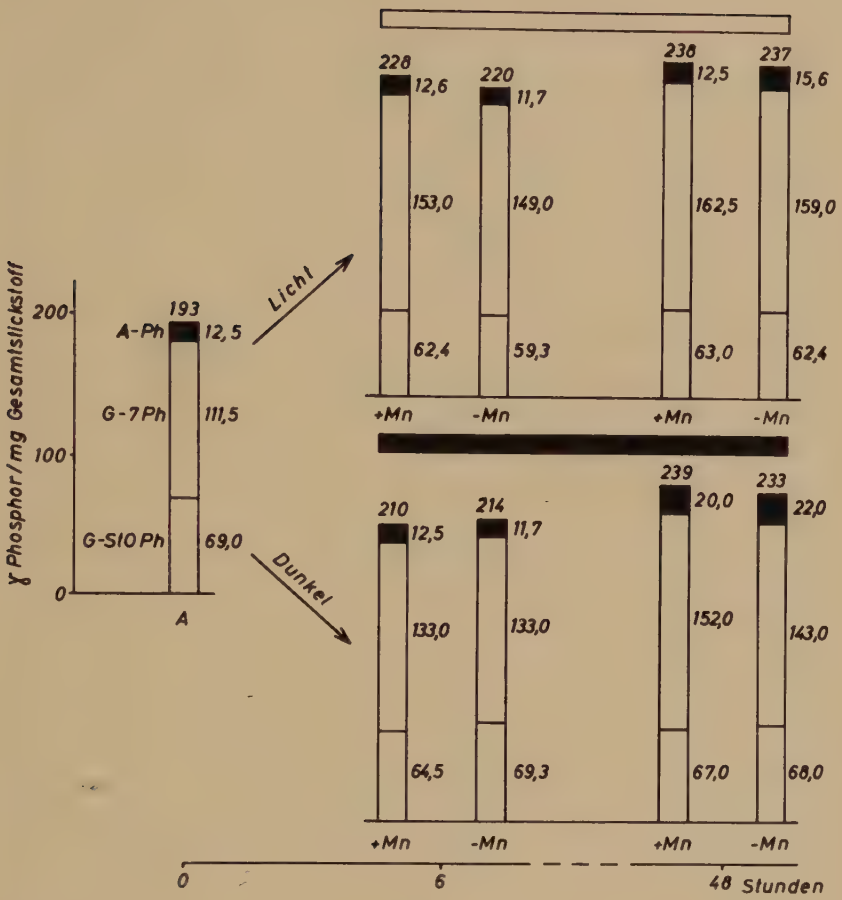

Abb. 22: Die Wirkung von Mangan auf verschiedene P-Fraktionen von Mn-Mangelzellen im Licht und im Dunkeln in Abwesenheit von CO_2 und Nitrat.
+Mn = Nährlösung enthält Normaldosis als $MnCl_2$
-Mn = $MnCl_2$ wurde einfach weggelassen
Die Nitrationen waren durch aequimolare Mengen Chlorionen ersetzt.
Das Ausgangsmaterial (A) war 6 Tage lang im Dauerlicht in Mn-Mangellösung in Anwesenheit von CO_2 und Nitrat angezogen worden.

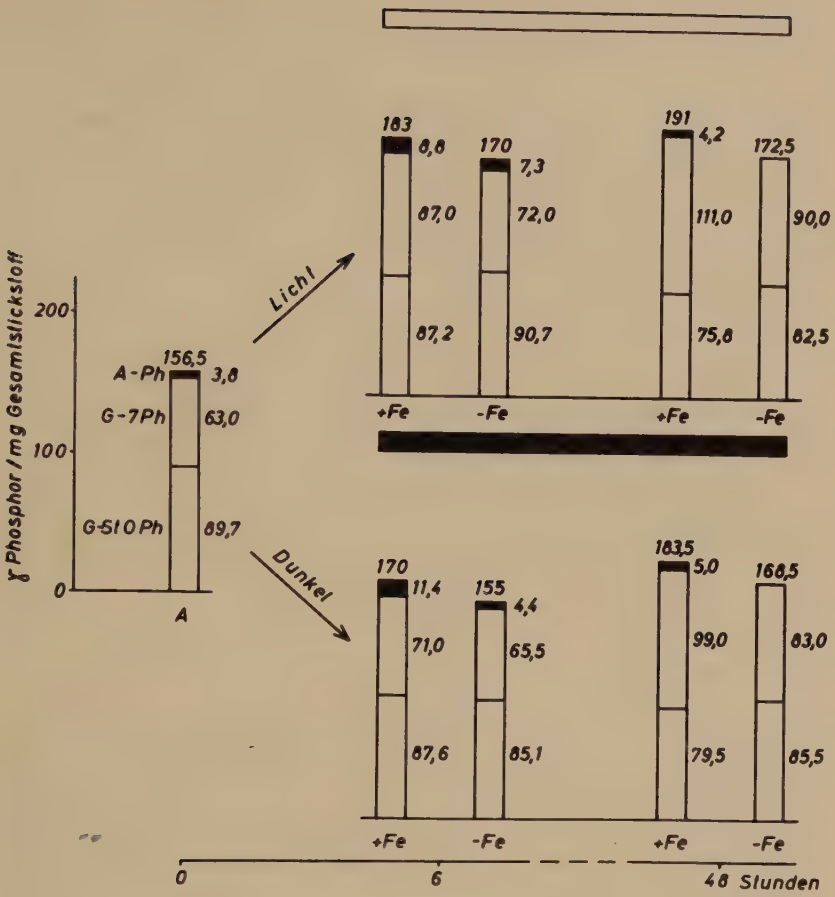

Abb. 23: Die Wirkung von Eisen auf verschiedene P-Fraktionen von Fe-Mangelzellen im Licht und im Dunkeln in Abwesenheit von CO_2 und Nitrat.
+Fe = Nährlösung enthält Normaldosis Fe als $FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$
-Fe = $FeSO_4$ wurde einfach weggelassen
Die Nitrationen waren durch aequimolare Menge Chlorionen ersetzt.
Das Ausgangsmaterial (A) war 6 Tage lang im Dauerlicht in Fe-Mangellösung in Anwesenheit von CO_2 und Nitrat angezogen worden.

1. Mn-Wirkung auf Manganmangelzellen (Abb. 22)

Mn-Mangelzellen, nach früheren Erfahrungen (PIRSON 1937) unter den gegebenen Bedingungen durch eine sehr selektive leicht reversible Photosynthesehemmung ausgezeichnet, sprechen in ihren Phosphatfraktionen auf den Mn-Zusatz kaum an. Zwar ist im Dunkeln und noch mehr im Licht infolge des Entzugs von CO_2 und Nitrat eine deutliche und kontinuierliche Steigerung der labilen Phosphate festzustellen, die mit einer Erhöhung der Phosphataufnahme insgesamt einhergeht. Das wesentliche Merkmal des Versuches ist aber das Ausbleiben einer deutlichen Manganwirkung. Offensichtlich sind die in der Phosphatzusammensetzung zum Ausdruck kommenden Stoffwechselvorgänge von dem hier in Betracht kommenden Mangelbereich unberührt. Dies ist insofern in Übereinstimmung mit den vorliegenden Kenntnissen von den Mn-Wirkungen, als diese in erster Linie zur photosynthetischen O_2-Produktion führende Reaktionskette betreffen (KESSLER 1957), nicht dagegen die photosynthetische Phosphorylierung, soweit diese an isolierten Chloroplasten untersucht wurde (ARNON 1958).

2. Fe-Wirkung auf Eisenmangelzellen (Abb. 23)

Die früh chlorotischen Zellen erwiesen sich in Übereinstimmung mit ihren Gaswechselreaktionen (PIRSON u. Mitarb. 1952) auch im analytischen Verhalten (vgl. S. 29) als relativ reaktionsträge. Immerhin war im Dunkeln und noch mehr im Licht eine mit der Zeit zunehmende Anreicherung der labilen Phosphate zu beobachten, zum geringen Teil auf Kosten des ungewöhnlich hohen Gehalts an stabilem organischen Phosphat. Angesichts des beim Fe-Defizits eingetretenen Schwundes der Plastidenpigmente erscheint es wahrscheinlich, daß auch die Cytochrome in Mitleidenschaft gezogen sind, teils durch direkten Mangel am konstitutiven Schwermetall, teils durch ein Defizit an den zugehörigen Proteinen. Aus Arbeiten von NICHOLAS u. COMISSIONG (1957), sowie NICHOLAS u. GOODMAN (1958) wissen wir, daß die Aktivität der Eisenenzyme von Neurospora von Fe-Mangel ihre Aktivität einbüßen und Fe-Zufuhr im Laufe von 24 Stunden wiederhergestellt werden kann. Cytochrome sollen nach LUNDEGÅRDH für die Phosphataufnahme mitverantwortlich sein. Es mag daher zutreffen, daß (vgl. KRAMER 1956 und LUNDEGÅRDH 1958) eine mit der Phosphataufnahme verbundene oxydative Reaktion als Fe-bedürftiger Prozeß den Dunkelumsatz des Phosphats bestimmt. Für die Fe-Abhängigkeit der zu-

sätzlichen Lichtphosphorylierung sind ebenfalls in der Literatur Belege vorhanden, die neuerdings vor allem von ARNON (1959) in Betracht gezogen werden.

3. Mg-Wirkung auf Mg-Mangelzellen (Abb. 24)

Der vergleichsweise tiefgreifende Effekt schon des beginnenden Mg-Mangels erschwert die Beurteilung der Mg-Wirkungen insofern, als mit einem erheblichen Abbau der Kontrollzellen während des Versuchsverlaufes gerechnet werden muß. Immerhin ist in der Zeit von 6 Stunden nach Mg-Gabe wohl noch ein unmittelbarer Vergleich statthaft. Sowohl im Licht als auch im Dunkeln steigert der Mg-Zusatz den bereits hohen Gehalt an labilen Phosphaten. Zu den offensichtlich im Mg-Mangel schlecht verwertbaren labilen Phosphaten kommt nun das labile Phosphat hinzu, welches mit Hilfe des hinzutretenden Magnesiums neu gebildet und nun unter den gegebenen Bedingungen (CO_2- und Nitrat-Entzug) ebenfalls nicht die normalen Acceptoren findet. Im Unterschied zur K-Wirkung betrifft die Wirkung des Mg deutlich die Phosphatbindung im Licht und im Dunkeln. Dies läßt sich mit Erfahrungen der Enzymologie (McELROY u. NASON 1954) und der Biochemie der belichteten Chloroplasten (ARNON, WHATLEY u. ALLEN 1954, MUDD 1959) in Einklang bringen. Das Ergebnis der Mg-Wirkung nach einem Verlauf von 48 Stunden erscheint zunächst im Licht und im Dunkeln erstaunlich. Man kann es aber auf zweierlei Weise deuten. Entweder hat sich die Reaktion der ersten 6 Stunden sehr verstärkt und zu einer enormen Anreicherung von labilen Phosphaten geführt,oder Destruktion der Mangelzelle ist rapide (Verlust von Stickstoff durch Abbau und Abgabe ins Medium) vorangeschritten, da ja an eine echte Erholung in Abwesenheit von CO_2 und Nitrat nicht zu denken ist. Für die letztere Deutung spricht der ebenfalls kräftige (apparente) Anstieg des Gesamtphosphats (bei ungefähr konstanter Proportion der Fraktionen) auch in der Mg-frei verbliebenen Kontrollsuspension.

Unsere Daten reichen gerade beim Mg-Mangel noch keineswegs aus, um den hier offenbar besonders komplexen Mangelzustand ausreichend zu kennzeichnen. Hier ist eine ausführlichere Spezialuntersuchung vorgesehen.

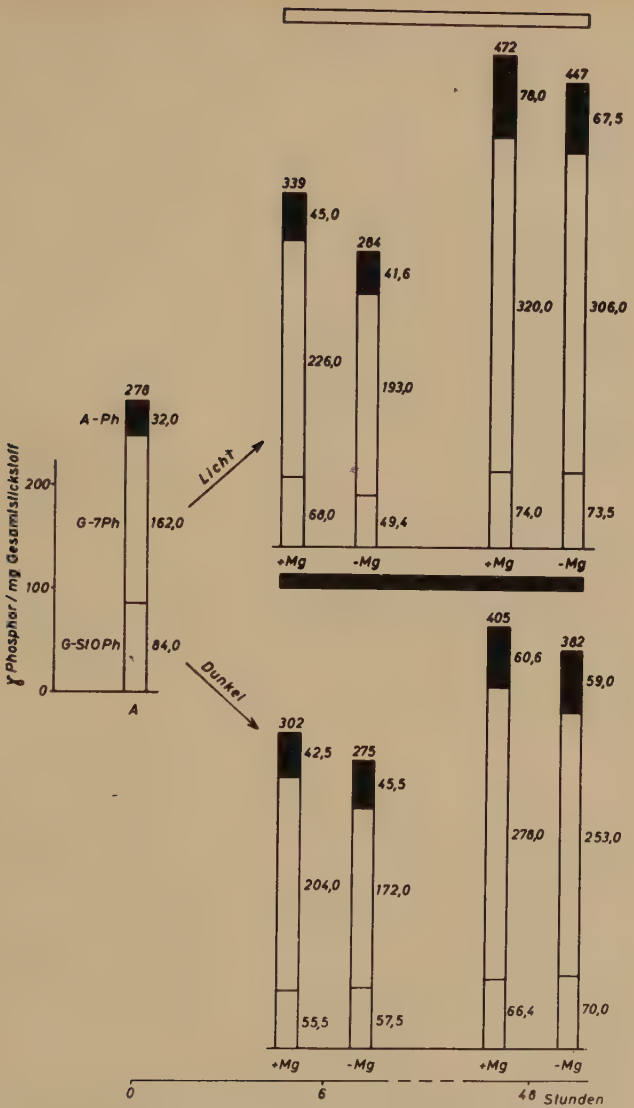

Abb. 24: Die Wirkung von Magnesium auf verschiedene P-Fraktionen von Mg-Mangelzellen im Licht und im Dunkeln in Abwesenheit von CO_2 und Nitrat.
+Mg = Nährlösung erhielt Normaldosis Mg als $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$
-Mg = Nährlösung behielt als Ersatz für $MgSO_4$ die entsprechende Menge Na_2SO_4
Die Nitrationen waren durch die aequimolare Menge Chlorionen ersetzt.
Das Ausgangsmaterial (A) war 6 Tage lang im Dauerlicht in Mg-Mangellösung (1/250 der normalen Mg-Konzentration) in Anwesenheit von CO_2 und Nitrat angezogen worden.

Besprechung der Ergebnisse

Die einzigen analytisch-chemischen Untersuchungen, die bisher für K-Mangel von Chlorella vorliegen, betreffen die Bestimmung des Chlorophyllgehalts. Aus der eindeutigen und schon bei relativ geringem K-Mangel einsetzenden Chlorose wurde seinerzeit (PIRSON 1937, PIRSON u. Mitarb. 1952) indirekt auf eine entsprechende Störung im Proteinstoffwechsel geschlossen, d.h. das Chlorophyll als ein in erster Näherung geeigneter Indikator für den Eiweißspiegel angesehen. Diese Annahme bedarf nach den jetzt vorliegenden Erfahrungen einer Korrektur. Das Verhältnis Chlorophyll/Gesamt-N sowie das Verhältnis Chlorophyll/Protein bildet im K-Mangel keine Konstante. Vielmehr sinkt das Chlorophyll gegenüber dem Protein stärker ab; bei Wiederzugabe des K nimmt das Chlorophyll nach einigen Stunden unabhängig vom N-Gehalt zu. Bemerkenswerterweise tritt der Effekt im Dunkeln besonders deutlich hervor. Zu den zahlreichen Wirkungen des Kaliums kommt somit ein spezifischer Effekt auf die Chlorophyllbildung hinzu. Diese Feststellung berührt natürlich nicht die früher erhobenen Befunde, welche für die raschen Veränderungen von Photosynthese und Atmung der Kaliummangelzellen nach K-Zufuhr eine Unabhängigkeit von Chlorophyll sichergestellt haben. Die Wirkung des Kaliums auf das Chlorophyll muß in dieser zeitlichen Beziehung weiterhin als Folgesymptom gewertet werden.

Den bisherigen Erwartungen widerspricht auch, daß sich das Gesamteiweiß der Chlorellazellen im mäßigen K-Mangel als recht stabil erwiesen hat. Die Verschiebung des Verhältnisses Eiweiß-N/löslichem N, welche den ersten Beginn einer Proteolyse anzeigt, macht sich erst in einem späten Mangelstadium bemerkbar und darf daher kaum mehr als ein spezifisches und daher in unserem Zusammenhang interessantes Mangelmerkmal betrachtet werden. Diese Beobachtung zeigt deutlich die Vorteile, welche die Verwendung einzelliger Algen bei der Analyse von Mineralsalzmangelerscheinungen bietet. Denn bei höheren Pflanzen (Blättern) tritt das letztgenannte Mangelsymptom offenbar so frühzeitig auf, daß es sehr schwer wird, vorangehende Effekte des frühen K-Mangels zu erfassen (vgl. STEINBERG 1953).

Wenn in K-Mangelzellen schon recht frühzeitig das Verhältnis Gesamt-N/Trockengewicht niedrige Werte besitzt, so ist dies nicht etwa eine Angelegenheit des Stickstoff-Umsatzes, sondern auf eine Anhäufung

von Kohlenhydraten zurückzuführen. Dies frühe Mangelsymptom geht mit der bekannten Hemmung der Photosynthese und der Steigerung der Atmung einher. Dies Zusammentreffen bedeutet keinen Widerspruch, sondern erklärt sich zwanglos durch die Annahme, daß das Photosyntheseprodukt (Kohlenhydrate) als Rohmaterial des Baustoffwechsels im K-Mangel äußerst schlecht verwertet wird, Bau- und Betriebsstoffwechsel somit nicht mehr in der normalen Regulation stehen. Dies ergibt sich auch daraus, daß trotz gesteigerter Photosynthese und herabgesetzter Atmung nach der Wiederzufuhr von K der Kohlenhydratspiegel zunächst sinkt, und zwar im Licht und im Dunkeln. Der energetische Leerlauf im K-Mangel von Chlorella, den PIRSON (1955) postuliert und DANIEL (1956) im Falle der oxydativen Dunkelassimilation demonstriert hat, dürfte somit auch auf Grund unserer analytischen Daten als ein leicht reversibles Symptom des K-Mangels sichergestellt sein. Für heterotrophe Organismen (Aspergillus) ist schon vor langem auf den schlechten ökonomischen Koeffizienten im K-Mangel hingewiesen worden (RIPPEL u. BEHR 1936).

Der Versuch, diese energetischen Bedingungen bei K-Mangel und dessen Beseitigung durch die Analyse der entsprechenden Phosphatfraktionen zu belegen, mußte nach Lage der Dinge von vornherein auf erhebliche Schwierigkeiten stoßen. Bevor hierauf näher eingegangen wird, sei auf die vor kurzem von LATZKO und Mitarb. sowie von MECHSNER mitgeteilten Befunde verwiesen, nach denen bei Chlorella nach K-Verarmung die Aufnahme von anorganischem Phosphat in organische Bindung ("7 min"-Phosphate) deutlich gefördert wurde, wenn Kalium (bzw. Rubidium) im Licht zugefügt wurden. Diese Versuche sind in Anlehnung an eine von KANDLER (1950) angegebene Technik durchgeführt, bei der die kurzfristigen Änderungen des Phosphatspiegels im Übergang vom Dunkelstoffwechsel zum Lichtstoffwechsel erfaßt werden. Auch während der Belichtung förderte das K kurzfristig die Bildung von Phosphat, wenn es den verarmten Zellen dargeboten worden war. Diese Befunde werden von den Beobachtern als Beweis für den Einfluß des Kaliums auf die Lichtphosphorylierung angesehen und zu entsprechenden Ergebnissen an K-verarmter Hefe (LATZKO u. CLAUS 1958) in Verbindung gesetzt, wo es sich natürlich nur um einen Einfluß auf die oxydative Phosphorylierung handelt. Für eine allgemeine Rolle des Kaliums bei Phosphorylierungsvorgängen lagen schon vorher, insbesondere von dem Arbeitskreis von LARDY enzymologische Daten vor, die sich zur Erklärung des K-Mangelstoffwechsels, sowie des Mechanismus der kurzfristigen Stoffwechseländerungen im Ver-

lauf der Erholung von K-Mangel anboten (vgl. hierzu PIRSON u. Mitarb. 1952, PIRSON 1955 und 1958).

Unsere Fragestellung unterscheidet sich von derjenigen der letztgenannten Autoren unter anderem dadurch, daß nicht mit verarmten Zellen normaler Anzucht, sondern mit Mangelzellen gearbeitet wurde, wobei natürlich im Interesse einer Analyse des Mangelzustandes besonders auf die frühen Mangelsymptome geachtet werden mußte; in dieser Hinsicht läßt sich ein Anschluß an die Beobachtungen an verarmten Zellen ermöglichen. Ob man mit selektiv verarmten Zellen (soweit sich solche überhaupt herstellen lassen) oder mit Mangelzellen arbeitet, wird von Fall zu Fall von der gewählten Fragestellung abhängen.

Obwohl unsere analytischen Untersuchungen weder Übergangsphänomene im Phosphatspiegel (im Sinne von KANDLER) noch rasche "turnover"-Effekte erfassen, welche die Isotopentechnik zu messen gestattet (SIMONIS u. Mitarb.), liefern sie doch weitere Anhaltspunkte für eine spezifische Rolle des Kaliums im Phosphatumsatz. Da die Algen labile Phosphate langfristig in Polyphosphaten festzulegen vermögen, läßt sich ein Phosphorylierungserfolg besonders dann fassen, wenn die energetische Verwertung der labilen Phosphate wenigstens teilweise, z. B. durch Entzug von CO_2 und Nitraten unterbunden wird. Wenn wir die Bildung der gesamten "7 min"-Phosphate bei geeigneter Versuchsanstellung in Übereinstimmung mit zahlreichen Autoren als Indikator für Licht- oder Dunkelphosphorylierungsvorgänge ansehen, so enthalten wir uns dabei doch einer Stellungnahme zu der vorerst etwas kontroversen Frage, ob die in der "7 min"-Phosphatfraktion enthaltenen Polyphosphate lediglich Phosphatspeicher darstellen oder auch eine gewisse energetische Bedeutung haben können, wofür durch KORNBERG (1957) wieder einige enzymologische Gesichtspunkte beigebracht worden sind.

K-Mangelzellen sind nach unseren Erfahrungen relativ arm an energiereichem Phosphat; bei mäßigem K-Mangel wird die Phosphorylierung durch K-Zugabe gefördert, wobei eine Sonderwirkung des Lichts unverkennbar ist. Offensichtlich ist der Kaliumbedarf der Lichtphosphorylierung größer als derjenige der Dunkelphosphorylierung. Dieser Sachverhalt wird von MECHSNER (1959) ebenfalls hervorgehoben und durch die Formulierung ausgedrückt, K-Mangelzellen verhielten sich hinsichtlich der Phosphorylierung im Licht wie Dunkelzellen. Ob ein solcher unterschiedlicher

Anspruch beider Reaktionssysteme allein auf quantitativ verschiedenem Umsatz beruht oder mit der verschiedenen Lokalisation in der Zelle zusammenhängt, steht hier nicht zur Debatte. An allgemein unterschiedlichen Reaktionsbedingungen und -ansprüchen dürfte jedenfalls kein Zweifel bestehen (vgl. ARNON 1958, KANDLER 1958).

Eine erhebliche Komplikation für die Auswertung der Phosphorylierungsversuche ergibt sich daraus, daß Phosphorylierung und Phosphataufnahme stets mit einander verbunden sind. Es gelang in keinem Falle, eine Phosphorylierung ausschließlich auf Kosten des in den Zellen vorhandenen Phosphatspiegels zu erzielen. Das Problem scheint nun in der Alternative zu bestehen, ob eine erfolgte Phosphorylierung automatisch eine Phosphataufnahme nach sich zieht oder umgekehrt, ob auf die Phosphataufnahme ebenso automatisch die Phosphorylierung folgt. Nach übereinstimmender Ansicht einer Reihe von Autoren ist allerdings die Phosphataufnahme selbst nur auf dem Wege über eine Phosphorylierung möglich (KAMEN u. SPIEGELMAN 1948, ROTHSTEIN 1954, JENNINGS, HOOPER u. ROTHSTEIN 1958 und STENLID 1959). Dies wird zunächst für die Dunkelphosphorylierung angenommen. Im Falle der Lichtphosphorylierung könnten die Verhältnisse grundsätzlich ähnlich liegen: Licht und Kalium fördern gemeinsam die Phosphorylierungsprozesse in Chloroplasten, zunächst auf Kosten der Reserven an anorganischem Phosphat, die jedoch sogleich durch entsprechenden Einsatz des extraplastidären Systems, d.h. durch oxydative Phosphorylierung ergänzt werden. Eine unmittelbare Wirkung des Lichts auf die Phosphataufnahme mit nachfolgender Phosphorylierung in Plastiden ist jedenfalls ein Vorgang, der schwieriger zu deuten wäre, wenn er auch nach den Angaben von SIMONIS und EHRENBERG (1957) über eine Lichtwirkung auf den Phosphatspiegel von Hefezellen nicht völlig undenkbar erscheint. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist die kräftige Steigerung von Phosphataufnahme und Phosphorylierung, die man erhält, wenn den K-Mangelzellen zugleich mit dem Kalium Licht und CO_2 geboten wird. Wenn auch die dabei eintretenden Phosphatumsätze im einzelnen mit unseren träge arbeitenden Analysenmethoden nicht faßbar sind, so spricht die Beobachtung doch sehr für die große Bedeutung eines hohen Spiegels an umsetzbaren Kohlenhydraten (in unserem Falle dem Photosyntheseprodukt) für die durch oxydative Phosphorylierung vermittelte Phosphataufnahme, wie dies auch von anderen Autoren für verschiedene Versuchsobjekte beschrieben wird (Zitate hierzu auf S. 44). Ob bei dem Mechanismus einer durch Kalium geförderten Lichtphosphory-

lierung und der daran gekoppelten Phosphataufnahme gewisse Trägersubstanzen (vgl. KRAMER 1956, ROBERTSON 1956) mitwirken, die vom Kohlenhydratspiegel abhängen, braucht hier nicht diskutiert zu werden. Wir halten die Annahme, daß unter unseren Versuchsbedingungen das Kalium die Phosphataufnahme erst sekundär beeinflußt und seine primäre Wirkung im Mechanismus der Phosphorylierung ausübt, zur Zeit für hinreichend begründet.

Eine andere Frage ist, ob die beobachtete Wirkung des K auf die Lichtphosphorylierung zugleich die Ursache für die kurzfristig reversible Änderung des photosynthetischen Gaswechsels ist, die früher beschrieben wurde. LATZKO u. MECHSNER und MECHSNER halten aufgrund ihrer Erfahrungen diese naheliegende Verbindung der Phänomene für gegeben. Wie PIRSON (1958) betont hat, wäre zur sicheren Beurteilung ein Vergleich der K- und Phosphormangelalgen empfehlenswert. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob die bereits bekannten Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Stoffwechselverhalten dieser beiden Mangelzustände auf eine einheitliche und gemeinsame Ursache zurückgeführt werden können. Daß sich die Wirkung des Kaliums auf die Lichtphosphorylierung zwangsläufig auch im Photosyntheseverhalten auswirken muß, kann nach dem derzeitigen Forschungsstande mit ziemlicher Sicherheit angenommen werden, doch bleibt die Möglichkeit offen, daß das K auch andere Voraussetzungen bzw. Teilmechanismen der Photosynthese zu regulieren vermag.

Die Untersuchung der übrigen Mangelzustände (Mn-, Fe- und Mg-Mangel) ist in der vorliegenden Arbeit nur in großen Zügen und zum Zwecke des Vergleichs mit dem K-Mangel vorgenommen worden. Sie sollte vor allem dartun, daß die Mangelzustände nicht nur durch ihr Gaswechselverhalten, sondern auch mit analytischer Methodik charakterisiert werden können. Im Unterschied zu vielen Arbeiten an Blättern höherer Pflanzen hat sich gezeigt, daß die Zusammensetzung der verschiedenen Mangelalgen durchaus spezifische Merkmale zeigt. Wenn auch in manchen Einzelheiten vorerst noch Unklarheiten bestehen bleiben, so lassen sich doch einige interessante Züge aus dem Vergleich der Mangelstadien ableiten.

Es liegt nahe, die beiden Elemente Kalium und Mangan, deren unmittelbare Wirkung auf den Gaswechsel gesichert ist, in ihren analytischen Merkmalen einander gegenüberzustellen. In beiden Fällen ist die Photosynthese kurzfristig reversibel gehemmt, der Kohlenhydratgehalt aber bei

Mn niedrig, bei K dagegen ungewöhnlich hoch. K- und Mn-Zufuhr haben dementsprechend in beiden Fällen gegenläufige Folgen. Gleichzeitig unterscheiden sich K- und Mn-Mangelzellen auch in ihren Phosphatfraktionen; die labilen Phosphate sind im K-Mangel zurückgedrängt, im Mn-Mangel aber angereichert. K- und Mn-Zufuhr haben bei geeigneten Versuchsbedingungen auch hier unterschiedliche Wirkungen auf die Mangelzellen.

Während das K die Phosphorylierung besonders im Licht fördert, bleibt die Phosphorylierung im Mn-Mangel und bei Aufhebung desselben ganz unbeeinflußt. Diese Tatsachen lassen sich in guten Einklang mit der Erfahrung bringen, daß das Mn seine spezifische Wirkung an vergleichsweise peripherer Stelle, nämlich im Verlauf der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung ausübt (KESSLER 1957); demgegenüber greift das Kalium zentral in den Energiestoffwechsel, insbesondere in die Lichtphosphorylierung ein und bestimmt daher die Merkmale, welche für den Grad der assimilatorischen Verarbeitung der Rohstoffreserven (Kohlenhydrat) bezeichnend sind.

Bei Mg- und Fe-Mangel liegen die Verhältnisse insofern anders, als hier nach den Ergebnissen der Gaswechseluntersuchungen von vornherein mit recht tiefgreifenden Eingriffen in den Zellstoffwechsel gerechnet werden müßte. Die Analysendaten unterstreichen diese Erwartungen. Besonders bei Mg-Mangel ist der Proteinstoffwechsel gestört und offenbar infolge davon der Chlorophyllspiegel erniedrigt, während im Fe-Mangel der Chlorophyllschwund ein mehr unmittelbarer sein dürfte. Die Phosphorylierungsvorgänge, die nach Erfahrungen der Enzymologie stark vom Mg bestimmt sein dürften, lassen sich infolge der schwereren strukturellen Störungen in den Mangelzellen nur unvollkommen fassen. Vielleicht ist es gerade in dem Falle des Mg ratsam, bei künftigen Untersuchungen von verarmten Normalzellen auszugehen.

Zusammenfassung

1. Kaliummangelzellen von Chlorella wurden durch Bestimmung ihres Gehalts an Kohlenhydrat, Gesamtstickstoff, Protein, Chlorophyll, sowie verschiedener Phosphatfraktionen biochemisch charakterisiert. Das Verhalten der Zellen bei Wiederzufuhr des fehlenden Kaliums im Licht und im Dunkeln wird in die Untersuchung einbezogen. Zum Vergleich wurden auch einige entsprechende Versuche bzw. Analysen an Mn-, Fe- und Mg-Mangelzellen durchgeführt.

2. Kaliummangel äußert sich in einem reversibel erhöhten Kohlenhydratgehalt, niedrigem Gesamtstickstoff und in einem relativ geringen Gehalt an labilen Phosphaten.

3. Das Chlorophyll ist von K-Mangel stärker als das Protein betroffen; die Chlorophyllsynthese erscheint daher direkt abhängig von der Kaliumversorgung.

4. Durch geeignete Versuchsanstellung (Entzug von CO_2 und Nitrat) konnte ein Einfluß des Kaliums auf die Bildung labiler Phosphate im Licht nachgewiesen werden. Die Phosphorylierungsvorgänge im Dunkeln sind vergleichsweise weniger kaliumabhängig.

5. Mn-Mangelzellen enthalten wenig Kohlenhydrate und viel labiles Phosphat; Chlorophyll- und Eiweißgehalt sind nicht vermindert.

6. Mg- und Fe-Mangel zeigen frühzeitig tiefgreifende Mangelsymptome. Insbesondere bei Mg-Mangel erscheint der Stickstoffhaushalt und die Verwertung phosphatgebundener Energie stark beeinträchtigt. Bei Fe-Mangel ist der Gehalt an labilen Phosphaten niedrig; die Fraktion des anorganischen Phosphats ist hier besonders stark vermindert.

7. Die gefundenen analytischen Daten werden diskutiert und im Zusammenhang mit den früher ermittelten Kennzeichen des photosynthetischen und respiratorischen Gaswechsels im Mineralsalzmangel gebracht.

ALBAUM, H.G., A.SCHATZ, S.H.HUNTER and A.HIRSCHFELD,
Phosphorylated compounds in Euglena.
Arch. Biochem. 29, 210-218 (1950)

ALBERTS-DIETERT, F.,
Die Wirkung von Eisen und Mangan auf die Stickstoffassimilation von Chlorella.
Planta 32, 88-117 (1941)

ARNON, D.I., Chloroplasts and Photosynthesis.
In: The photochemical apparatus, its structure and function, Brookhaven Symposia in Biology, 11 (1958)
(Brookhaven National Laboratory associated Universities, Inc. Upton, New York)

ARNON, D.I., Conversion of light into chemical energy in Photosynthesis.
Nature 184, 10-21 (1959)

ARNON, D.I., F.R.WHATLEY and M.B. ALLEN,
Photosynthesis by isolated chloroplasts.
II. Photosynthetic phosphorylation, the conversion of light into phosphate bond energy.
J. Amer. Chem. Soc. 76, 6324-6329 (1954)

BERGMANN, L., Stoffwechsel und Mineralsalzernährung einzelliger Grünalgen.
II. Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß mineralischer Faktoren bei heterotropher und mixotropher Ernährung.
Flora 142, 493-539 (1955)

BIERHUIZEN, J.F.,
Observations on K-dificiency in Lemna minor L.
Mededelingen van de Landbouwhogeschool te Wageningen/Nederland 54, 311-319 (1954)

COMAR, C.L. and F.P. ZSCHEILE,
Analysis of plant extracts for chlorophylls a and b by a photoelectric spectrophotometric method.
Plant, Physiol. 17, 198-209 (1942)

DANIEL, A., Stoffwechsel und Mineralsalzernährung einzelliger Grünalgen.
III. Atmung und oxydative Assimilation von Chlorella.
Flora 143, 31-66 (1956)

FALES, F.W., The Assimilation und degradation of carbohydrates by yeast cells.
J. Biol. Chem. 193, 113-124 (1951)

FRIEDMAN, S. and C.L. FOX,
Studies on the relationship of Potassium to metabolism and purine Biosynthesis in Escherichia coli.
J. Bacteriol. 68, 186-193 (1954)

GRUBE, K.H., Über den Zusammenhang von Phosphathaushalt und Photosynthese bei Helodea densa.
Planta 42, 279-303 (1953)

HELDER, R.J., Analysis of the process of anion uptake of intact maize plants.
Acta bot. neerl. 1, 361-434 (1952)

JENNINGS, D.H., D.C. HOOPER and A. ROTHSTEIN,
The participation of phosphate in the formation of a "carrier" for the transport of Mg^{++} and Mn^{++} ions into yeast cells.
J. Gen. Physiol. 41, 1019-1026 (1958)

KAMEN, M.D. and S. SPIEGELMAN,
Studies on the phosphate metabolism of some unicellular organisms.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 13, 151-163 (1948)

KANDLER, O., Über die Beziehungen zwischen Phosphathaushalt und Photosynthese.
I. Phosphatspiegelschwankungen bei Chlorella pyrenoidosa als Folge des Licht-Dunkel-Wechsels.
Z. Naturforschg. 5 b, 423-437 (1950)

KANDLER, O., The effect of 2,4 Dinitrophenol on respiration, oxidative assimilation and photosynthesis in Chlorella.
Physiol. Plant. 11, 675-684 (1958)

KESSLER, E., Stoffwechselphysiologische Untersuchungen an Hydrogenase enthaltenden Grünalgen.
I. Über die Rolle des Mangans bei Photoreduktion und Photosynthese.
Planta, 49, 435-454 (1957)

KORNBERG, S.R.,
Adenosine triphosphate synthesis from polyphosphate by an enzyme from Escherichia coli.
Biochem. Biophys. Acta 26, 294-300 (1957)

KRAMER, P.J., The uptake of salts by plant cells.
In: Handb. Pflanzenphysiol., 2, 290-315, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1956)

KUHL, A., Über den Phosphathaushalt von Hydrodictyon reticulatum.
Diss. Marburg (1957)

LARDY, H.A., The influence of inorganic ions on phosphorylation reactions.
In: "Phosphorus Metabilism" Vol. I, 477-499
(Ed. W.D. McElroy and B. Glass, Baltimore, Md. 1951)

LATZKO, E. und D. CLAUS,
Aerobe Phosphorylierung unter dem Einfluß von K^+, Na^+, Rb^+ und NH_4^+.
Naturwiss. 45, 59-60 (1958)

LATZKO, E. und Kl. MECHSNER,
Bedeutung der Alkali-Ionen für die Intensität der Lichtphosphorylierung bei Chlorella vulgaris.
Naturwiss. 45, 247-248 (1958)

LINDBERG, O. and L. ERNSTER,
Determination of organic phosphorus compounds by phosphate analysis.
In: Methods of biochemical analysis, Edit. by: D. Glick, Vol. III, 1-22.
New York: Interscience Publishers (1956)

LORENZEN, H., Synchrone Zellteilungen von Chlorella bei verschiedenen Licht-Dunkel-Wechseln.
Flora 144, 473-496 (1957)

LORENZEN, H., Die photosynthetische Sauerstoffproduktion wachsender Chlorella bei langfristig intermittierender Belichtung.
Flora 147, 382-404 (1959)

LUNDEGÅRDH, H.,
Investigations on the mechanism of absorption and accumulation of salts.
II. Absorption of Phosphate by Potato tissue.
Physiol. Plant. 11, 564-571 (1958)

McELROY, W.D. and A. NASON,
Mechanism of action of micronutrient elements in Enzyme Systems.
Ann. Rev. Plant Physiol. 5, 1-30 (1954)

MECHSNER, Kl., Untersuchungen an Chlorella vulgaris über den Einfluß der Alkali-Ionen auf die Lichtphosphorylierung.
Biochem. Biophys. Acta 33, 150 (1959)

MUDD, J.B., Interaction of Magnesium and Adenosine diphosphate in photosynthetic phosphorylation.
Nature 183, 900-901 (1959)

NEEB, O., Hydrodictyon als Objekt einer vergleichenden Untersuchung physiologischer Größen.
Flora 139, 39-95 (1952)

NICHOLAS, D.J.D. and K. COMISSIONG,
Effects of Molybdenum, Cupper and Iron on some enzymes in Neurospora crassa.
J.Gen.Microbiol. 17, 699-707 (1957)

NICHOLAS, D.J.D. and T. GOODMAN,
The effects of deficiencies of Zinc and Iron on some enzyme systems in Neurospora.
J.Exptl.Bot. 9, 97-108 (1958)

PIRIE, N.W., Proteins.
In: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, herausgegeben von Paech, K. and M.V. Tracey, Bd. IV, S. 23-68.
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1955)

PIRSON, A., Ernährungs- und Stoffwechselphysiologische Untersuchungen an Fontinalis und Chlorella.
Z.Bot. 31, 193-267 (1937)

PIRSON, A., Über die Wirkung von Alkali-Ionen auf Wachstum und Stoffwechsel von Chlorella.
Planta 29, 231-261 (1939)

PIRSON, A., Functional aspects in mineral nutrition of green plants.
Ann.Rev.Plant Physiol. 6, 71-114 (1955)

PIRSON, A., Mineralstoffe und Photosynthese.
In: Handb. d. Pflanzenphysiol. 4, 355-381, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1958)

PIRSON, A., Manganese and its role in photosynthesis.
In Trace Elements, 81-98 (1958)
Academic Press Inc., New York, N.Y.

PIRSON, A. und A. KUHL,
Über den Phosphathaushalt von Hydrodictyon I.
Arch. Mikrobiol. 30, 211-225 (1958)

PIRSON, A. und F. SEIDEL,
Zell- und stoffwechselphysiologische Untersuchungen an der Wurzel von Lemna minor L. unter besonderer Berücksichtigung von Kalium und Kalziummangel.
Planta 38, 431-473 (1950)

PIRSON, A., C. TICHY und G. WILHELMI,
Stoffwechsel und Mineralsalzernährung einzelliger Grünalgen.
1. Vergleichende Untersuchungen an Mangelkulturen von Ankistrodesmus.
Planta 40, 199-253 (1952)

RIPPEL, A. und G. BEHR,
Über den Energieumsatz bei Aspergillus niger unter dem Einfluß der Kaliumversorgung.
Arch. Mikrobiol. 7, 315-322 (1936)

ROBERTSON, R.N.,
The mechanism of absorption.
In: Handb. d. Pflanzenphysiol. 2, 449-467,
Berlin-Göttingen-Heidelberg (1956)

ROTHSTEIN, A., The enzymology of the cell surface.
Protoplasmatologia II E 4. (1954)
Springer Verlag in Wien.

SCHLEGEL, H.G.,Die Verwertung organischer Säuren durch Chlorella im Licht.
Planta 47, 510-526 (1956)

SCHNEIDER, W.C.,
Phosphorus compounds in animal tissues.
I. Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid.
J. biol. Chem. 161, 293-303 (1945)

SCHWINCK, L., Nachweis von Adenosintriphosphorsäure (ATP) in Grünalgen und Helodea sowie Einbau von radioaktivem Phosphor (P^{32}) bei der Photosynthese.
Planta 47, 165-218 (1956)

SIMONIS, W. und M. EHRENBERG,
Untersuchungen zur lichtabhängigen Phosphorylierung. IV. Die Wirkung des Lichtes auf die P^{32}-Einlagerung bei Chlorophyll-freien Pflanzenzellen und -geweben.
Z. Naturforschg. 12 b, 156-163 (1957)

SIMONIS, W. und K.H. GRUBE,
Untersuchungen über den Zusammenhang von Phosphathaushalt und Photosynthese.
Z. Naturforschg. 7 b, 194-196 (1952)

STEINBERG, R.A.,
Correlations between Protein-Carbohydrate metabolism and mineral dificiencies in Plants.
In Mineral Nutrition of Plants, 359-386
(Truog, E., Ed., Univ. of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin, 1953)

STENLID, G., On the effect of some sugars and of 2,4 Dinitrophenol upon the absorption of phosphate ions by excised roots.
Physiol. Plant. 12, 199-217 (1959)

STICH, H., Der Nachweis und das Verhalten von Metaphosphaten in normalen, verdunkelten und trypaflavinbehandelten Acetabularien.
Z. Naturforschg. 8 b, 36-44 (1953)

WIAME, J.M., The occurance and physiological behaviour of two metaphosphate fractions in yeast.
J. biol. Chem. 178, 919-929 (1949)

WINTERMANS, J.F.G.M.,
Polyphosphate formation in Chlorella in relation to photosynthesis.
Mededelingen van de Landbouwhogeschool
te Wageningen/Nederland 55, 69-126 (1955)

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. A. Pirson,
danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die
stete Förderung und Unterstützung, die er mir hat zuteil werden lassen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die gewährten
Unterstützungen.

Lebenslauf

Am 21. Januar 1932 wurde ich, Samir Soliman Aly Badour, als Sohn des Staatsbeamten Soliman Aly Badour und seiner Ehefrau Fathia Badour in Kairo geboren. Meine Schulausbildung erfolgte nach aegyptischem System und schloß 1949 mit dem Baccalaureat ab. Anschließend besuchte ich die Universität Kairo (Faculty of Science) zum Studium der Fächer: Botanik, Zoologie, Chemie und Physik. Nach dem Schlußexamen 1953 erhielt ich den Grad B. Sc. (Hons) in (special Botany). Danach erfolgte Anstellung als Assistent am Botanischen Institut der Universität in Kairo. 1956 erhielt ich von der Regierung der Vereinigten Arabischen Republik ein Stipendium zum Studium in Deutschland. Ich bezog daraufhin die Universität Marburg, wo ich bei Herrn Prof. Dr. A. Pirson meine Doktorarbeit begann. Dort studierte ich während 3 Semester und besuchte die Vorlesungen der Herren Professoren Pirson, v.Stosch, Bücher und Dozent Dr. Kessler.

In Göttingen hörte ich die Vorlesungen der Herren Professoren Pirson, Brockmann und Schlegel.